



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Cotutelle internationale avec :

Università degli Studi di Perugia

---

Présentée et soutenue par :

**Matteo Pallottini**

Le 18/2/2015

**Titre :**

QUALITÉ BIOLOGIQUE DES EAUX DOUCES ET IMPACT DES MÉTAUX LOURDS  
SUR LES POPULATIONS ET COMMUNAUTÉS DE MACROINVERTÉBRÉS

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED SDU2E : Écologie fonctionnelle

**Unité de recherche :**

EcoLab

**Directeur(s) de Thèse :**

Régis CEREHINO

Enzo GORETTI

Elda GAINO

**Rapporteurs :**

Lorenzo TANCIONI; Christian DESVILETTES

**Autre(s) membre(s) du jury :**

Régis CEREHINO; Enzo GORETTI



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PERUGIA  
Dottorato di Ricerca in Biologia ed Ecologia - XXVII ciclo



UNIVERSITÉ TOULOUSE III - PAUL SABATIER  
Ecole Doctorale Sciences de l'Univers, de l'Environnement et de l'Espace

### **TESI DI DOTTORATO**

QUALITÀ BIOLOGICA DEI CORSI D'ACQUA E IMPATTO DEI METALLI PESANTI SULLE  
POPOLAZIONI E COMUNITÀ DI MACROINVERTEBRATI

---

QUALITÉ BIOLOGIQUE DES EAUX DOUCES ET IMPACT DES MÉTAUX LOURDS SUR LES  
POPULATIONS ET COMMUNAUTÉS DE MACROINVERTÉBRÉS

---

FRESHWATERS BIOLOGICAL QUALITY AND IMPACT OF HEAVY METALS ON  
MACROINVERTEBRATES POPULATIONS AND COMMUNITIES

Settore scientifico-disciplinare BIO/05

Dottorando

Dott. Matteo Pallottini

Relatori

Prof. Enzo Goretti

Prof.ssa Elda Gaino

Prof. Régis Céréghino

Coordinatore Prof. Fabio Franciolini

ANNO ACCADEMICO 2013/2014





UNIVERSITÉ  
TOULOUSE III  
PAUL SABATIER



Dottorato in Co-Tutela di Tesi tra Università degli Studi di Perugia e Université Toulouse III - Paul Sabatier



Dipartimento di Chimica, Biologia e Biotecnologie (ex Dipartimento di Biologia Cellulare e Ambientale ed ex Dipartimento di Chimica)

Prof.ssa Roberta Selvaggi, Prof. David Cappelletti



EcoLab - Laboratoire écologie fonctionnelle et environnement



Erasmus Placement - Lifelong Learning Programme

# INDICE

<b>PREMESSA</b>	<b>vii</b>
<b>AVANT-PROPOS</b>	
 <b>CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE</b>	 <b>1</b>
 <i><b>PARTE 1 - METALLI PESANTI E POPOLAZIONI DI MACROINVERTEBRATI</b></i>	
 <b>CAPITOLO 2 - MALFORMAZIONI DELL'APPARATO BOCCALE IN LARVE DI CHIRONOMIDI</b> <b>MALFORMATIONS DE L'APPAREIL BUCCAL DES LARVES DE CHIRONOMIDÉS</b>	 <b>11</b>
2.1    Introduzione	13
2.2    Materiali e metodi	15
2.3    Risultati	20
2.4    Discussioni	27
2.5    Conclusioni	30
2.6    Ring test dell'analisi delle malformazioni di chironomidi	31
 <b>CAPITOLO 3 - BIOACCUMULO DEI METALLI PESANTI NEL GAMBERO ROSSO DELLA LOUISIANA</b> <b>BIOACCUMULATION DE MÉTAUX LOURDS CHEZ L'ÉCREVISSE ROUGE DE LOUISIANE</b>	 <b>35</b>
3.1    Introduzione	37
3.2    Materiali e metodi	39
3.3    Risultati	43
3.4    Discussioni	48
3.5    Conclusioni	51
 <i><b>PARTE 2 - METALLI PESANTI E COMUNITÀ DI MACROINVERTEBRATI</b></i>	
 <b>CAPITOLO 4 - IMPATTO DEI METALLI PESANTI SULLE COMUNITÀ ATTRAVERSO L'ANALISI BASATA SUI TRATTI BIO-ECOLOGICI</b> <b>IMPACT DES MÉTAUX LOURDS SUR LES COMMUNAUTÉS - ANALYSE BASÉE SUR LES TRAITS BIO-ÉCOLOGIQUES</b>	 <b>55</b>
4.1    Introduzione	57
4.2    Materiali e metodi	59
4.3    Risultati	66
4.4    Discussioni	76
4.5    Conclusioni	79

<b>CAPITOLO 5 - IMPATTO DEI METALLI PESANTI SULLE COMUNITÀ DI MACROINVERTEBRATI NEL SISTEMA IDROGRAFICO</b>	<b>81</b>
<b>IMPACT DE MÉTAUX LOURDS SUR LA DIVERSITÉ DES COMMUNAUTÉS BENTHIQUES À L'ÉCHELLE DU RÉSEAU HYDROGRAPHIQUE</b>	
5.1 Introduzione	83
5.2 Materiali e metodi	86
5.3 Risultati	93
5.4 Discussioni	98
5.5 Conclusioni	101
<b>CAPITOLO 6 - IMPATTO DEI METALLI PESANTI SULLE COMUNITÀ ATTRAVERSO L'ANALISI BASATA SU UN INDICE MULTIMETRICO</b>	<b>103</b>
<b>UN INDICE MULTIMÉTRIQUE POUR ÉVALUER L'IMPACT DES MÉTAUX LOURDS SUR LES COMMUNAUTÉS AQUATIQUES</b>	
6.1 Introduzione	105
6.2 Materiali e metodi	107
6.3 Risultati	116
6.4 Discussioni	120
6.5 Conclusioni	122
<b>CAPITOLO 7 - CONCLUSIONI</b>	<b>123</b>
<b>CONCLUSIONS</b>	
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>127</b>
<b>RIASSUNTO</b>	<b>151</b>
<b>RÉSUMÉ</b>	<b>153</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>155</b>

---

NOTA: i capitoli 2 - 6 sono stati organizzati per essere analizzati in modo autonomo. Pertanto sono frequenti casi di ridondanza nella tesi, in particolare nelle sezioni “Materiali e Metodi” dei suddetti capitoli.



## PREMESSA

I sistemi fluviali sono recettori di numerose sostanze inquinanti e i sedimenti hanno un ruolo importante nell'accumulo dei contaminanti. L'additività, il sinergismo, l'antagonismo e i processi di trasformazione degli agenti tossici nei sedimenti sono fenomeni che influenzano la tossicità totale. I metalli pesanti sono tra gli inquinanti più frequenti con un importante impatto ecologico a causa della loro tossicità, persistenza e non-degradabilità nell'ambiente. Alti livelli di metalli negli ecosistemi d'acqua dolce indicano di norma la presenza di fonti inquinanti antropiche (effluenti industriali, miniere, impianti di raffinazione, dilavamento di terreni agricoli, scarichi domestici e deposizioni atmosferiche).

Nei sedimenti, i metalli pesanti possono presentare diversa mobilità, interazioni e biodisponibilità. Pertanto, un approccio basato esclusivamente sui parametri chimici non può essere sufficiente per una corretta valutazione degli effetti sul biota. Poiché i macroinvertebrati dei corsi d'acqua vivono a stretto contatto con i sedimenti, i cambiamenti funzionali e strutturali delle loro comunità riflettono il livello di degrado della qualità ambientale, in modo da risultare efficienti bioindicatori. Inoltre, alcuni taxa sono caratterizzati dal presentare fenomeni di accumulo di sostanze tossiche o dal manifestare malformazioni morfologiche in relazione ai più comuni contaminanti come metalli pesanti ma anche pesticidi, idrocarburi policiclici aromatici e policlorobifenili.

Lo scopo della tesi di dottorato è stato quello di analizzare l'impatto della contaminazione da metalli pesanti (cadmio, piombo, cromo, zinco, nichel e rame) e di misurarne l'effetto della tossicità sugli organismi negli ecosistemi dei corsi d'acqua. A tal fine, le analisi sono state condotte prendendo in considerazione: i) il livello di popolazione, attraverso l'uso di due specie bioindicatrici; ii) il livello di comunità, mediante analisi condotte con tre diversi approcci metodologici.

Nel dettaglio, sono state analizzate:

- le malformazioni dell'apparato boccale (*mentum*) delle larve di *Chironomus riparius* (Diptera), come *endpoint* di tossicità, per valutare gli effetti della contaminazione da metalli pesanti nei sedimenti (Capitolo 2);
- le relazioni tra la contaminazione da metalli pesanti nei sedimenti e il loro bioaccumulo nei tessuti di *Procambarus clarkii* (gambero alloctono), prendendo in considerazione i tessuti dell'epatopancreas, organo di detossificazione, e quelli della muscolatura addominale, contaminata in maniera indiretta, per azione dell'emolinfa (Capitolo 3);



- le relazioni tra le comunità di macroinvertebrati e le caratteristiche ambientali di un bacino fluviale i cui sedimenti sono contaminati, in vari settori, da metalli pesanti, attraverso l'analisi dei tratti funzionali dei macroinvertebrati (Capitolo 4);
- le *Self-Organizing Map* per illustrare come i modelli di diversità dei macroinvertebrati possano essere espressione dell'inquinamento di un corso d'acqua, con particolare riferimento alla contaminazione da metalli pesanti (Capitolo 5);
- numerose metriche per sviluppare e validare un indice multimetrico basato sulla comunità di macroinvertebrati, per valutare la salute ecologica in corsi d'acqua che presentino siti non impattati (o a basso impatto) e siti impattati con contaminanti come i metalli pesanti. L'indice è stato calibrato per essere generalista e in accordo con i requisiti della *Water Framework Directive* dell'Unione Europea (WFD) (Capitolo 6).

## AVANT-PROPOS

Les systèmes fluviaux sont récepteurs de nombreux polluants et les sédiments ont un rôle important dans l'accumulation de contaminants. Les processus d'additivité, de synergie, d'antagonisme et de transformation des substances toxiques dans les sédiments sont des phénomènes qui affectent la toxicité totale.

Les métaux lourds sont parmi les polluants les plus fréquents avec un impact écologique important en raison de leur toxicité, leur persistance et leur non-dégradabilité dans l'environnement. Des concentrations élevées de métaux dans les écosystèmes d'eau douce révèlent généralement la présence de sources anthropiques de pollution (effluents industriels, mines, usines de raffinage, ruissellement des terres agricoles, eaux usées domestiques et dépôts atmosphériques).

Dans les sédiments, les métaux lourds peuvent avoir différentes mobilités, interactions et biodisponibilités. Par conséquent, une approche fondée uniquement sur des paramètres chimiques peut ne pas être suffisante pour une bonne évaluation des effets sur le vivant. Les macroinvertébrés des cours d'eau vivent en contact étroit avec les sédiments et les changements fonctionnels et structurels dans leurs communautés reflètent le niveau de dégradation de la qualité de l'environnement. Ils sont ainsi des bioindicateurs efficaces. En outre, certains taxons présentent des phénomènes d'accumulation de substances ou de développement de malformations morphologiques en relation avec les contaminants toxiques les plus communs.

comme les métaux lourds, mais aussi les pesticides, les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les polychlorobiphényles.

L'objectif de cette thèse est d'analyser l'impact de la contamination par les métaux lourds (cadmium, plomb, chrome, zinc, nickel et cuivre) et l'effet de leur toxicité sur les organismes de rivières. Nous pris en compte les niveaux d'analyse de l'individu/population, grâce à l'utilisation de deux espèces bio-indicatrices, et le niveau de la communauté, par des analyses reposant sur trois approches méthodologiques différentes.

Dans le détail, nous avons analysé :

- les malformations du *mentum* des larves de *Chironomus riparius* (diptères), comme critère d'évaluation de toxicité, pour mesurer les effets de la contamination par les métaux lourds dans les sédiments (chapitre 2);
- les relations entre la contamination aux métaux lourds des sédiments et leur bioaccumulation dans les tissus de l'Écrevisse de Louisiane (espèce allochtone), en prenant en considération les tissus de l'hépatopancréas (tissus de détoxification) des muscles abdominaux (tissus non détoxifiant) (chapitre 3);
- les relations entre les communautés de macroinvertébrés et les caractéristiques environnementales d'un bassin versant comprenant des zones contaminées par des métaux lourds, à travers l'analyse des traits fonctionnels des macroinvertébrés (chapitre 4);
- la distribution des différents taxons en relation avec la variabilité spatiotemporelle des conditions environnementales naturelles et des pollutions (chapitre 5);
- la réponse des communautés à la pollution chimique (métaux lourds et nutriments) au travers de la construction et de la validation d'un indice multimétrique basé sur la notion d'écart à la référence, en accord avec les exigences de la directive européenne cadre sur l'eau (DCE) (chapitre 6).



# 1

## INTRODUZIONE

Negli ultimi decenni, il veloce progresso tecnologico delle attività antropiche ha determinato un elevato impatto sulla qualità ambientale con un continuo incremento del degrado degli habitat e del rischio di estinzione per molte specie animali e vegetali, con evidenti ripercussioni anche sulla salute umana. In effetti, la produzione industriale, agricola e zootecnica, in combinazione con la crescita della popolazione e la conseguente urbanizzazione, sono le principali cause del degrado degli ecosistemi, in particolare di quelli acquatici (EEA, 1999; Gomez-Gutierrez et al., 2007; Li et al., 2010).

Tra i diversi contaminanti, i metalli pesanti sono di primaria importanza poiché sono tra gli inquinanti più frequenti che si ritrovano nell'ambiente. I metalli pesanti, con l'eccezione del ferro appartengono ai cosiddetti “elementi in traccia”, presenti nei più comuni suoli e rocce della crosta terrestre in concentrazioni inferiori a 0,1%. Sebbene non ci sia ancora una definizione universalmente riconosciuta per il termine metalli pesanti (Duffus, 2002), si considerano tali circa 70 elementi chimici (una ventina quelli rilevanti da un punto di vista ambientale) che hanno una densità superiore a 5 g/cm<sup>3</sup>, un peso atomico maggiore di 20, una grande affinità con i solfuri e presentano diversi stati di ossidazione (cationi) a seconda delle condizioni di pH.

I metalli pesanti rappresentano una fonte di potenziale tossicità per l'uomo e per il biota dovuta alla capacità di inibire enzimi, legandosi con gruppi reattivi (zolfo, ossigeno, azoto), di catalizzare reazioni redox e di interferire con alcuni elementi essenziali camuffandosi nelle reazioni biochimiche (Jarup, 2003; Tchounwou et al., 2012).

Alcuni metalli pesanti (Fe, Co, Cr, Cu, Mg, Se, Zn) sono essenziali perché necessari nei cicli fisiologici e biochimici degli organismi viventi e un difetto o un eccesso della loro concentrazione può causare l'insorgenza di patologie (Ingrao et al., 1995); altri invece (As, Cd, Hg, Pb) non risultano necessari per i processi metabolici e pertanto sono tossici anche a basse concentrazioni. In sintesi, la tossicità dei metalli pesanti, come quella di tutti gli elementi, si manifesta quando un organismo è esposto a quantità che superano i meccanismi omeostatici (Nielsen, 2000). Alcuni

metalli pesanti possono accumularsi lungo il flusso di energia che attraversa la rete alimentare, ne derivano fenomeni di bioaccumulo e di biomagnificazione.

Il bioaccumulo viene definito come quel processo che provoca un incremento della concentrazione chimica di un composto xenobiotico in un organismo rispetto alla sua concentrazione nell'ambiente circostante; esso deriva da tutte le possibili vie d'esposizione, dal trasporto attraverso le superfici respiratorie e dermali fino all'assunzione attraverso l'alimentazione. La biomagnificazione è un caso speciale di bioaccumulo in cui la concentrazione del contaminante nell'organismo è maggiore rispetto alla concentrazione dello stesso negli organismi che entrano a far parte della sua dieta. Si tratta di un'amplificazione del contaminante dal basso verso l'alto della catena trofica e pertanto gli elementi che sono biomagnificati hanno un potenziale di trasferimento trofico maggiore di 1 (Reinfelder et al., 1998).

Gli organismi possono quindi bio-trasferire (bioaccumulare o biomagnificare) i metalli pesanti raggiungendo concentrazioni sufficientemente elevate da provocare effetti nocivi (Naimo, 1995; Liu et al., 2009).

I fiumi svolgono un ruolo importante nel trasporto (intervallato da fasi di accumulo) dei contaminanti lungo i sistemi idrografici (Holt, 2000; Gomez-Gutierrez et al., 2006; Davutluoglu et al., 2011). Pertanto, gli ecosistemi d'acqua dolce presentano un'alta vulnerabilità essendo particolarmente soggetti all'inquinamento di tipo chimico (metalli pesanti, pesticidi, microinquinanti organici, carico organico) oltre a quello di tipo fisico (interventi in alveo, variazione del regime idrologico e impatto termico) e biologico (pesca eccessiva, immissione di specie alloctone); il tutto influenza in maniera negativa la diversità delle loro biocenosi (Compín e Céréghino, 2007).

Il carico di metalli di un sistema fluviale è influenzato e regolato da una varietà di fattori come la geologia del bacino, la geomorfologia, la reattività chimica, la litologia, l'idrologia, la vegetazione e la produttività biologica (Garrels et al., 1975; Warren, 1981; Aurada, 1983; Jain e Sharma, 2006). Tuttavia, la presenza di alti livelli di inquinamento da metalli pesanti negli ecosistemi d'acqua dolce solitamente è dovuta a effluenti industriali, miniere, impianti di raffinazione, dilavamento di terreni agricoli, scarichi domestici e deposizioni atmosferiche (Abbas et al., 2008; Klavinš et al., 2000; Yu et al., 2001a).

Nell'ambito dell'ecosistema fluviale i sedimenti hanno un'elevata capacità di assorbire gli inquinanti (Cairns et al., 1984; Chapman, 1990; Estebe et al., 1997) tanto che la contaminazione è

di norma maggiore rispetto alla colonna d'acqua (Chapman, 1989). In effetti, i sedimenti si possono comportare come serbatoi di contaminanti che vengono poi rilasciati nella colonna d'acqua e/o accumulati nei tessuti di animali e piante, entrando così nella catena trofica (Gibbs, 1977; Jain e Sharma, 2001; Filgueiras et al., 2002; Davutluoglu et al., 2011). Nei sedimenti, i metalli pesanti possono essere presenti in varie forme chimiche, mostrando diverse interazioni, mobilità, disponibilità biologica e tossicità potenziale (Arnason e Fletcher, 2003; Singh et al., 2005; Liu et al., 2009). La misura della disponibilità biologica dei metalli varia a seconda del taxon considerato ed è influenzata da determinate variabili ambientali del sedimento/acqua (Admiraal et al., 2000; Mäenpää et al., 2003; Desrosiers et al., 2008).

Negli ecosistemi acquatici, gli effetti dei metalli pesanti sulla composizione delle comunità biologiche e sui modelli di abbondanza delle specie sono stati poco studiati (Hickey e Clements, 1998; De Jonge et al., 2008; Zhou et al., 2008) mentre sono ben conosciute le conseguenze degli alti livelli di nutrienti (Dodson et al., 2000). Inoltre, i metalli pesanti hanno impatti evidenti su individui di alcune popolazioni (ad esempio malformazioni dell'apparato boccale di insetti-ditteri, Di Veroli et al., 2014), mentre questi effetti (come le malformazioni morfologiche) non hanno necessariamente un riscontro a livello di comunità (Liess e Beketov, 2011), complicando così la valutazione dello stato di salute del corso d'acqua attraverso sopralluoghi biologici di routine.

Tuttavia, numerosi studi hanno evidenziato che un approccio basato esclusivamente sui parametri chimici e chimico-fisici non può essere sufficiente per valutare l'effetto totale dell'inquinamento di un ecosistema sul suo biota (Rosemberg e Resh, 1993). In particolare, le sostanze inquinanti a basse concentrazioni, come i metalli pesanti, sono più difficili da rilevare, soprattutto quando dipendono da carichi variabili stagionalmente (Archaimbault et al., 2010; Liess e Beketov, 2011). Pertanto una corretta valutazione degli effetti dell'inquinamento si avvale di taxa bioindicatori (Johnson et al., 1992). Un bioindicatore è una specie indicatrice o un sistema biologico (un gruppo di specie o l'intera comunità) sensibile nei confronti di un'azione perturbatrice destinata a provocare alterazioni biochimico-fisiologiche-morfologiche, fino a variazioni della composizione della biocenosi dovuti al declino/scomparsa delle specie sensibili (Iserentant e De Sloover, 1976). L'analisi attraverso bioindicatori fornisce stime indirette, meno analitiche di quelle chimiche, ma più economiche ed in grado di evidenziare gli effetti sinergici di tutte le componenti ambientali, comprese variazioni di complessità biologica dovute a trasformazioni dinamiche della comunità.

I macroinvertebrati sono largamente utilizzati come indicatori biologici dell'impatto antropico sugli ecosistemi d'acqua dolce (Armitage et al., 1983; Bonada et al., 2006; Dolédec e Statzner, 2008) poiché vivono in stretto contatto con il substrato dei corsi d'acqua, dove i sedimenti possono fungere da deposito per i contaminanti (Warren, 1981; Yu et al., 2001a; Li et al., 2010).

I macroinvertebrati dei corsi d'acqua sono altamente integrati nella struttura e nel funzionamento delle biocenosi bentoniche (Southwood, 1977; Minshall, 1988), costituendo un'importante componente della produzione secondaria (Oertli, 1993). In condizioni non alterate, i cambiamenti funzionali nelle comunità di macroinvertebrati lungo il profilo longitudinale del corso d'acqua sono in stretta relazione con il suo variare delle caratteristiche chimico-fisiche da monte verso valle (Merritt e Cummins, 1978; Vannote et al., 1980; Cummins e Wilzbach, 1985). È noto che alcuni taxa bentonici accumulano sostanze tossiche (ad esempio metalli pesanti, pesticidi, IPA, PCB, etc.) e rispondono agli stress ambientali su una scala di unità tassonomica, sia attraverso il processo di biomagnificazione (Luoma, 1983; Naimo, 1995; Bervoets et al., 1997; Santoro et al., 2009), sia attraverso lo sviluppo di malformazioni morfologiche (vedi apparati boccali delle larve di chironomidi-Diptera) (Vermeulen, 1995; Di Veroli et al., 2012b, 2014).

È interessante notare che i macroinvertebrati rivelano in modo efficace la qualità biologica delle acque dolci anche a livello di comunità (composizione, schemi quantitativi). In effetti, le specie sensibili all'inquinamento tendono a diminuire in termini di abbondanza o a scomparire, in condizioni disturbate, a seconda del tipo e del grado di alterazione (Usseglio-Polatera e Beisel, 2002; Céréghino et al., 2003; Archaimbault et al., 2010).

Di conseguenza i macroinvertebrati possono essere utilizzati come organismi/sistemi biologici sentinella nei programmi di monitoraggio dei sistemi fluviali (Hare e Tessier, 1998; Nahmani e Rossi, 2003; Santoro et al., 2009).

Il presente lavoro di tesi di dottorato si inserisce all'interno di queste problematiche prefiggendosi di analizzare la contaminazione da metalli pesanti (in particolare Cr, Ni, Cu, Zn, Cd e Pb) nei corsi d'acqua attraverso una valutazione del loro impatto sui macroinvertebrati. Per fare questo sono stati presi in considerazione: i) il livello di popolazione, attraverso l'uso di due specie bioindicatrici, (*Chironomus riparius* Meigen 1804 e *Procambarus clarkii* Girard, 1852); ii) il livello di comunità, mediante analisi condotte con tre diversi approcci metodologici (tratti bio-ecologici, Self-Organizing Maps e indice multimettrico).

Il primo livello di analisi affronta l'aspetto delle alterazioni morfologiche considerando le malformazioni dell'apparato boccale (*mentum*) delle larve di *Chironomus riparius* (Diptera) un utile *endpoint* di tossicità per valutare il livello di contaminazione da metalli pesanti negli ecosistemi fluviali. La scelta di questo taxon è motivata dal fatto che esso è spesso usato come organismo chiave negli indici biotici, nei programmi di valutazione ambientale e nei test di tossicità (Ristola et al., 1999; De Haas et al., 2004; OECD, 2004; León Paumen et al., 2008; Di Veroli et al., 2012b).

Il presente studio riguarda un corso d'acqua dell'Italia centrale (Torrente Genna) situato in un'area soggetta ad un'intensa attività zootecnica dove metalli come il rame e lo zinco, oligoelementi essenziali per vari processi fisiologici negli animali, sono utilizzati in dosi elevate negli alimenti animali a causa della loro bassa efficienza di assimilazione (Eckel et al., 2003). Di conseguenza, uno smaltimento improprio degli effluenti zootecnici fa sì comporta che una parte sostanziale di tali metalli possa raggiungere ed inquinare il corpo idrico recettore (Mantovi e Bonazzi, 2004).

L'analisi delle malformazioni dei chironomidi è applicabile sia in ambienti naturali che in condizioni sperimentali controllate; per questo, lo *screening* delle malformazioni offre uno strumento biologico utile per rilevare e monitorare sostanze tossiche (per es. metalli pesanti, pesticidi, IPA, PCB) nei sedimenti (Hamilton e Sæther, 1971; Warwick, 1988; Canfield et al., 1994; Madden et al., 1995; Watts e Pascoe, 1996).

Il nostro gruppo di ricerca ha affrontato in precedenti lavori le relazioni tra le malformazioni di *Chironomus riparius* e le concentrazioni di metalli pesanti nei sedimenti di acque interne mediante test di laboratorio (Di Veroli et al., 2012b). Questi studi hanno evidenziato correlazioni significative tra le concentrazioni di metalli nei sedimenti e le malformazioni. Inoltre, sono state dimostrate correlazioni significative tra la concentrazione dei metalli nei sedimenti e le malformazioni, solo quando le larve erano esposte a una matrice nota di sedimenti contaminati artificialmente da metalli pesanti rispetto ai sedimenti naturali, che includevano una miscela tossica complessa, comprendente metalli pesanti oltre ad altri composti tossici non noti.

Lo scopo del presente studio è stato quello di affiancare alla sperimentazione di laboratorio l'indagine di campo, valutando l'incidenza delle malformazioni del *mentum* delle larve di chironomidi come una misura della tossicità dei metalli pesanti in un ecosistema di acque correnti.

Sempre nell'ambito del primo livello di analisi (livello di popolazione) si intende esaminare l'entità del bioaccumulo da metalli pesanti nei tessuti di una specie modello, quale il gambero alloctono *Procambarus clarkii*, prendendo in considerazione l'accumulo in due diverse tipologie di tessuto in



relazione all'azione detossificante dell'organismo: l'epatopancreas (organo di detossificazione) e la muscolatura addominale (contaminata in maniera indiretta, per azione dell'emolinfa).

La scelta del gambero rosso della Louisiana come bioindicatore è motivata dal fatto che si tratta di una specie tollerante alle condizioni sfavorevoli (Dörr et al., 2006), che tende a bioaccumulare i metalli, riflettendo così l'abbondanza di questi elementi nell'ambiente circostante, fungendo da specie sentinella per il monitoraggio della salute ambientale (Pastor et al., 1988; Rincón-León et al., 1988; Madigosky et al., 1991; Devi et al., 1996; Bollinger et al., 1997; Alcorlo et al., 2006).

Allo scopo, saranno valutate le relazioni tra l'entità della contaminazione da metalli pesanti nei sedimenti di un corso d'acqua, situato in un'area industriale dell'Italia Centrale, e il tasso di bioaccumulo nei diversi tessuti del gambero rosso.

Questo approccio metodologico si propone di studiare il livello di tossicità da metalli pesanti (valido solo per modelli dose/risposta monotoni) dei sedimenti, attraverso il rapporto tra il BSAF (*Biota to Sediment Accumulation Factor*) di un tessuto di detossificazione (epatopancreas) e il BSAF di un tessuto non detossificante (muscolatura addominale). Riteniamo che questo rapporto possa rappresentare un *marker* del livello di stress e pertanto un'utile misura degli effetti tossici dell'inquinamento da metalli pesanti.

Il secondo livello di analisi (livello di comunità) affronta gli effetti sulla comunità di macroinvertebrati in relazione alla contaminazione, in particolare quella dovuta alla presenza di metalli pesanti. È ben noto che non è facile prevedere la risposta della comunità bentonica sulla base delle concentrazioni degli inquinanti nell'ambiente e, soprattutto, gli effetti non sono sempre lineari con la concentrazione degli stessi contaminanti (Archaimbault et al., 2010; Statzner e Bêche, 2010).

Come prima valutazione a livello di comunità si è preso in considerazione l'analisi dei tratti biologici ed ecologici dei macroinvertebrati. Questa analisi svolge un ruolo centrale nella biovalutazione dei sistemi fluviali stressati, al fine di definire il livello di disturbo antropico (Usseglio-Polatera et al., 2000a; 2000b; 2001; Gayraud et al., 2003; Statzner et al., 2001; 2005; Santoul et al., 2005; Archaimbault et al., 2010; Fabrizi et al., 2010; Statzner e Bêche, 2010).

Infatti, nella valutazione delle condizioni ambientali di un corso d'acqua, l'aggregazione dei taxa in tratti funzionali basati sul ciclo vitale, sulla morfologia, sul comportamento, sulla fisiologia, sui requisiti dell'habitat e sulla sensibilità all'inquinamento (Chevenet et al., 1994; Tachet et al., 2010)

può effettivamente essere più informativa rispetto all'aggregazione in base alla collocazione tassonomica, poiché i tratti di un organismo sono indicativi della capacità di interagire con il proprio ambiente (Richards et al., 1997; Statzner et al., 1997; Usseglio-Polatera et al., 2000a; Usseglio-Polatera e Beisel, 2002; Bonada et al., 2006).

L'area di studio comprende il bacino del Fiume Nestore (Italia Centrale) dove gli insediamenti umani e le attività economiche hanno generato diverse e numerose fonti di inquinamento (acque di scarico di allevamenti zootecnici, acque di dilavamento dei terreni agricoli, scarichi civili ed industriali), che causano un inquinamento diffuso dovuto alla presenza di nutrienti e di metalli pesanti.

Il principale scopo dello studio è quello di valutare la qualità di un ecosistema fluviale espressa dai tratti funzionali dei macroinvertebrati in un contesto di differenti livelli di contaminazione chimica, comprendente anche quella da metalli pesanti.

Un'ulteriore valutazione a livello di composizione della comunità e di schemi di abbondanza dei macroinvertebrati a livello di bacino fluviale si basa sull'analisi delle Reti Neurali Artificiali (Artificial Neural Network, ANN).

Le reti neurali sono state impiegate con successo in vari aspetti della modellizzazione ecologica, come ad esempio per la classificazione di gruppi, per la schematizzazione di relazioni complesse, per la predizione dello sviluppo di popolazioni e comunità, per la modellizzazione dell'idoneità degli habitat e per la valutazione della qualità dell'acqua (Kaltchik et al., 2008). L'algoritmo delle Self-Organizing Map (SOM, unsupervised ANN, Kohonen, 1991) combinando le funzioni di ordinamento, clustering e analisi dei gradienti, descrive in modo soddisfacente i cambiamenti qualitativi e quantitativi osservati nelle comunità di macroinvertebrati nello spazio (stazioni) e nel tempo (stagioni) in relazione ai dati ambientali (nel nostro caso metalli pesanti e chimica delle acque) (Park et al., 2003; Céréghino e Park, 2009).

Il Bacino del Fiume Nestore (Italia Centrale) fornisce un contesto adatto per esaminare come le comunità di macroinvertebrati rispondano alla contaminazione chimica (nutrienti) e da metalli pesanti nello spazio e nel tempo, perché è interessato da numerose fonti di inquinamento risultanti dall'urbanizzazione, dall'industria, dall'agricoltura e dall'allevamento zootecnico intensivo. Inoltre, i sistemi di depurazione dei reflui nell'area sono inefficienti o addirittura assenti. Scopo di questa indagine basata sulle *Self-Organizing Map* è quello di illustrare come i modelli di diversità dei macroinvertebrati possano essere espressione dell'inquinamento di un corso d'acqua.

Infine, la valutazione della comunità bentonica ad invertebrati ha anche tenuto conto delle linee guida della Direttiva europea sulle acque (WFD, 2000/60/EC) dove la qualità ecologica viene definita rispetto ad una condizione di riferimento non alterata (Bailey et al., 2003; Chaves et al., 2011).

A tale proposito come strumenti per la valutazione della comunità bentonica sono stati utilizzati metodi basati sull'applicazione di indici multimetrici (Friberg et al., 2011; Hering et al., 2006; 2010). La combinazione di diverse categorie di metriche, che rispondono efficacemente ai cambiamenti della comunità a macroinvertebrati (diversità, tolleranza, ricchezza/abbondanza, tratti bio-ecologici) dovuti a differenti condizioni ambientali, risulta probabilmente più efficiente/affidabile rispetto all'utilizzo di una singola metrica (Barbour et al. 1999).

Lo scopo del presente lavoro è quello di predisporre (sviluppare e validare) un indice multimetrico per valutare la salute ecologica di corsi d'acqua di piccola-media dimensione dell'Italia Centrale, che si basi su un metodo di campionamento semplificato e che risponda a particolari categorie di inquinanti (come i metalli pesanti). Pertanto, tra numerose metriche biologiche note in letteratura saranno selezionate quelle che mostrano il miglior compromesso tra alta efficienza di discriminazione, bassa specificità, bassa ridondanza e alta stabilità in condizioni di riferimento. L'indice sarà calibrato per essere generalista, ossia per rispondere sia all'inquinamento delle acque sia alla contaminazione da metalli pesanti dei sedimenti.

# **PARTE 1**

**METALLI PESANTI E POPOLAZIONI DI MACROINVERTEBRATI**



# 2

## MALFORMAZIONI DELL'APPARATO BOCCALE IN LARVE DI CHIRONOMIDI

Sono state studiate le malformazioni delle larve di *Chironomus riparius* (Diptera) per valutare gli effetti tossici della contaminazione da metalli pesanti nel Torrente Genna (Italia Centrale), situato in un'area soggetta ad allevamenti intensivi di suini (40000 capi). Gli allevamenti zootecnici (attraverso la fertirrigazione) contribuiscono all'inquinamento da metalli nel Torrente Genna con un incremento di rame, zinco, cadmio, cromo e nichel nei sedimenti delle stazioni più a valle. L'incidenza delle malformazioni del *mentum* è risultata molto alta in tutte le stazioni di campionamento, circa il 56%. I più alti valori di malformazioni sono stati trovati nel tratto intermedio del torrente (St. 3: 65%) e a Marzo (66%), principalmente a causa di un incremento delle malformazioni gravi. L'alta incidenza di malformazioni gravi (30%) è attribuita all'alto livello di inquinamento da metalli pesanti nei sedimenti, in particolare rame e zinco, che mostravano il più alto valore medio alla St. 3 e a Marzo. Questo studio di campo riflette le relazioni tra le concentrazioni dei metalli nei sedimenti e le malformazioni dell'apparato boccale dei chironomidi, precedentemente osservate in test di laboratorio, e mette in luce queste malformazioni come *endpoint* di tossicità. Questa funzione apre la strada per il loro utilizzo come strumento efficace nei programmi di monitoraggio delle acque dolci per valutare gli effetti tossici della contaminazione da metalli pesanti. Il nostro gruppo di ricerca ha partecipato a un *ring test* internazionale sulle malformazioni del *mentum* delle larve di *Chironomus* spp.; i risultati del ring test sono stati utilizzati per calibrare il metodo di identificazione e di classificazione delle malformazioni da parte del nostro gruppo di ricerca, rispetto agli altri gruppi di esperti internazionali.

## MALFORMATIONS DE L'APPAREIL BUCCAL DES LARVES DE CHIRONOMIDÉS

Nous avons étudié les malformations des larves de *Chironomus riparius* (Diptera) dans le but d'évaluer les effets toxiques des métaux lourds du torrent Genna (Italie centrale), dans une zone soumise à une intensification de l'élevage porcin (40 000 têtes). Les élevages zootecniques, au travers de la fertilisation, contribuent à l'apport de métaux lourds dans le Genna, ce qui engendre une augmentation notable des concentrations en cuivre, zinc, cadmium, chrome et nickel dans les sédiments des stations les plus à l'aval. L'incidence des malformations du *mentum* est élevée à toutes les stations d'échantillonnage, avoisinant les 56%. Les plus fortes valeurs ont été trouvées dans la partie moyenne du cours d'eau au mois de Mars (65-66%), avec un fort accroissement des malformations sévères. L'incidence des malformations sévères (30%) est attribuée aux fortes pollutions en métaux lourds des sédiments, en particulier le cuivre et le zinc, dont les valeurs sont les plus élevées dans cette section de la rivière et à cette période. Cette étude de terrain a permis de montrer une relation entre la concentration en métaux lourds dans les sédiments et les malformations de l'appareil buccal des chironomes in natura (précédemment observée en laboratoire). Ces malformations se sont également révélées être un bon indicateur de toxicité, ouvrant la voie à leur utilisation comme outil efficace de biomonitoring des eaux douces. Nous avons enfin participé à un projet d'intercalibration international

portant sur l'utilisation des malformations du *mentum* des larves de *Chironomus* spp., qui a permis de calibrer notre méthode d'identification et de classification des malformations par rapport a celles d'autres groupes d'experts.

## 2.1 INTRODUZIONE

I fiumi sono soggetti all'inquinamento in quanto fungono da trasportatori per la materia disciolta e particolata, unitamente ai sedimenti, svolgendo, in particolare, un ruolo importante nell'accumulo e nel trasporto dei nutrienti, metalli ed altri contaminanti attraverso i sistemi fluviali (Davutluoglu et al., 2011).

I sedimenti dei corsi d'acqua possono fungere da serbatoi di metalli e le loro principali modalità di scambio sono l'adsorbimento o la deposizione; i metalli associati ai sedimenti possono essere rilasciati nella colonna d'acqua e/o accumularsi in piante e animali, entrando così nella rete trofica (Gibbs, 1977; Jain e Sharma, 2001; Filgueiras et al., 2002; Davutluoglu et al., 2011). Inoltre, nei sedimenti, i metalli pesanti possono essere presenti in un certo numero di forme chimiche, mostrando diverse interazioni, mobilità, disponibilità biologica e tossicità potenziale (Arnason e Fletcher, 2003; Singh et al., 2005; Liu et al., 2009).

Gli allevamenti zootecnici sono una fonte importante di metalli pesanti, che possono essere convogliati nei sistemi fluviali attraverso scarichi puntuali (svuotamenti irregolari) o diffusi (fertilizzazione).

Negli ultimi anni, particolare attenzione è stata data alla concentrazione ottimale di metalli utilizzati come oligoelementi negli alimenti animali, sia per soddisfare pienamente le esigenze nutrizionali degli animali sia per mitigare gli effetti negativi che gli attuali livelli di alcuni metalli possono avere sulla salute umana e sull'ambiente (Cottrill, 2003; Mantovi e Bonazzi, 2004). In particolare, rame e zinco (Eckel et al., 2003), oligoelementi essenziali per la manutenzione di vari processi fisiologici negli animali, sono utilizzati in dosi elevate a causa della loro efficienza di assimilazione generalmente molto bassa.

A causa dello smaltimento improprio degli effluenti degli allevamenti, una parte sostanziale dei metalli contenuti negli alimenti per gli animali può finire nei corpi idrici recettori (Mantovi e Bonazzi, 2004). Gli organismi acquatici possono bioaccumulare, biomagnificare o biotrasferire questi metalli raggiungendo concentrazioni sufficientemente elevate da provocare effetti nocivi (Naimo, 1995; Liu et al., 2009). Di conseguenza, il biota acquatico, in particolare le larve di insetti, possono essere utilizzate come organismi sentinella nei programmi di biomonitoraggio delle acque dolci (Hare e Tessier, 1998; Nahmani e Rossi, 2003; Santoro et al., 2009). Inoltre, molti taxa di insetti sono fortemente legati al sedimento e questo li rende utili bioindicatori della qualità dei sedimenti, mettendo in luce condizioni ambientali locali.



La maggior parte delle specie della grande famiglia di insetti Chironomidae vivono in ambienti d'acqua dolce. Tra questi, la specie *Chironomus riparius* Meigen 1804 è un organismo comune e ampiamente distribuito, presente in densità elevate anche in condizioni eutrofiche. È spesso usato come organismo chiave negli indici biotici, nei programmi di valutazione ambientale e nei test di tossicità (Ristola et al., 1999; De Haas et al., 2004; OECD, 2004; León Paumen et al., 2008; Di Veroli et al., 2012b). La crescita e l'emergenza sono utilizzati come *endpoint* di tossicità in questo tipo di protocolli, ma anche le malformazioni morfologiche (dell'apparato boccale) di queste larve stanno diventando un *endpoint* interessante per la valutazione degli ecosistemi d'acqua dolce. L'analisi delle malformazioni dei chironomidi è applicabile sia in condizioni di campo che di laboratorio, quindi lo screening delle malformazioni offre uno strumento biologico utilizzabile per rilevare e monitorare le sostanze tossiche nei sedimenti (Hamilton e Sæther, 1971; Warwick, 1988; Canfield et al., 1994; Madden et al., 1995; Watts e Pascoe, 1996).

In precedenza, sono state studiate, in test di laboratorio di larve di *C. riparius*, le relazioni tra malformazioni e concentrazioni di metalli pesanti nei sedimenti (Di Veroli et al., 2012b). In particolare, ci si è concentrati sull'induzione delle malformazioni dell'apparato boccale causate da miscele di metalli (Cr, Ni, Cu, Zn, Cd e Pb). Questo studio ha evidenziato correlazioni significative tra le concentrazioni di metalli nei sedimenti e le malformazioni.

Inoltre, sono state dimostrate correlazioni significative tra la concentrazione dei metalli nei sedimenti e le malformazioni, solo quando le larve erano esposte a una matrice nota di sedimenti contaminati artificialmente rispetto ai sedimenti naturali, che includevano una miscela tossica complessa e sconosciuta. Infatti, nei sedimenti naturali le sostanze tossiche possono avere una persistenza di lunga durata ed interagire in diverse combinazioni con elementi di nuova introduzione (Marking, 1985).

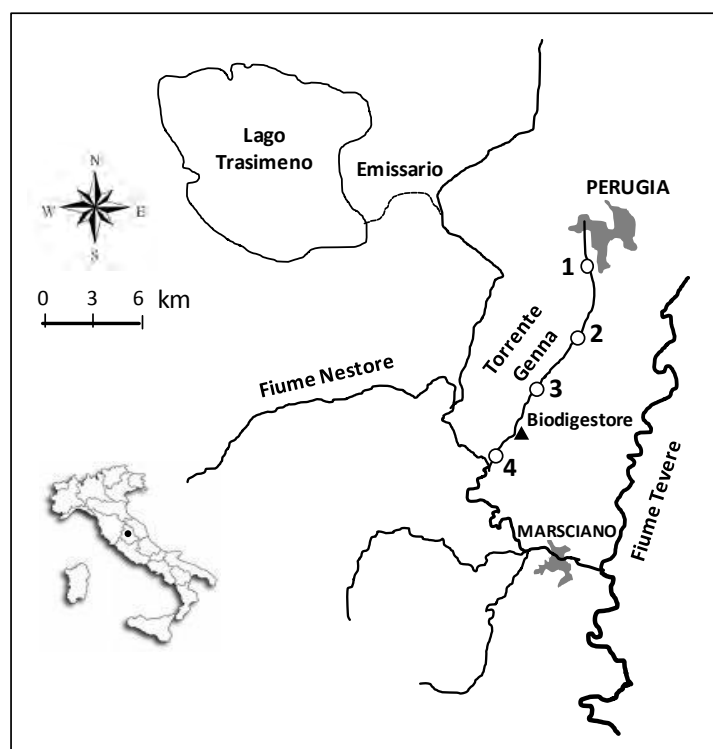
Lo scopo del presente studio è stato quello di estendere l'approccio di cui sopra, al campo, valutando l'incidenza delle malformazioni dell'apparato boccale delle larve di *C. riparius* come misura della tossicità di inquinanti ambientali, in particolare metalli pesanti, in un corso d'acqua drenante un'area sottoposta ad attività di allevamento intensivo.

## 2.2 MATERIALI E METODI

### *Area di studio*

Il Torrente Genna nasce alle pendici del monte Malbe, a 652 m s.l.m., vicino alla città di Perugia (Umbria) e 22,8 km più a sud confluisce nel Fiume Nestore, che è un affluente del Fiume Tevere (Italia Centrale). Il regime idraulico del Torrente Genna è fortemente influenzato dalle precipitazioni stagionali, anche se presenta le caratteristiche di un corso d'acqua perenne (ARPA Umbria, 2010).

Il campionamento (2010 - 2012) è stato condotto in quattro stazioni lungo l'intero corso del torrente, tra 242 m s.l.m. (St. 1) e 199 m s.l.m. (St. 4). L'ultima stazione è collocata all'incirca 0,7 km prima della confluenza con il Fiume Nestore e circa 2 km a valle dell'impianto di trattamento delle acque di scarico (biodigestore) degli allevamenti di suini (40000 capi, a piena capacità) (Fig. 2.1). Dall'estate 2009, un grande numero di aziende zootecniche (allevamenti suinicoli) nel bacino del Torrente Genna non hanno più potuto utilizzare l'impianto di trattamento dei liquami che è stato chiuso a causa di decisioni gestionali. Attualmente gli allevatori immagazzinano i liquami in lagune all'esterno degli allevamenti, prima di spargerli sui suoli, all'interno del bacino del torrente Genna, attraverso fertirrigazione agricola senza nessun tipo trattamento precedente. Questa situazione sta incrementando il carico organico del torrente.



**Figura 2.1** - Cartina dell'area di studio e localizzazione delle stazioni di campionamento (1 - 4).

### *Campagna di campionamento*

È stato svolto un campionamento preliminare (Maggio 2010 - Febbraio 2011) alla stazione 4 per analizzare la presenza e la consistenza delle malformazioni larvali di *C. riparius*. L'attuale campagna di campionamento ha interessato tutto il corso del torrente ed è stata effettuata in tre diversi campionamenti per ogni stazione (St. 1 - 4) da Marzo ad Ottobre 2012. Campioni di larve di chironomidi sono stati raccolti con un retino immanicato con maglie da 335  $\mu\text{m}$ ; sono state effettuate diverse repliche per avere a disposizione un numero significativo di larve (IV instar) di *C. riparius* (almeno 300 - 500 individui per stazione/stagione). I campioni sono stati trasportati in laboratorio per *sorting in vivo*. Sono stati misurati i principali parametri chimico-fisici delle acque e sono stati raccolti campioni di acqua e sedimento.

### *Caratterizzazione chimica e chimico-fisica delle acque superficiali*

I seguenti parametri chimico-fisici delle acque sono stati misurati *in situ*: temperatura, ossigeno disciolto (DO; Ossimetro F-Simplair Syland Scientific, precisione 1% del valore di scala, campo di misura: 0,0 - 20,0  $\text{O}_2 \text{ mg L}^{-1}$ ), pH (pHmetro Hanna Instruments HI-98150, scala: -4,00 - 19,99, risoluzione 0,01 pH, precisione  $\pm 0,02 \text{ pH}$ ) e conducibilità (HI8733-Hanna Instruments, scala: 0 - 1999  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , precisione 1%, risoluzione 1  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ).

Sono stati prelevati campioni di acqua in bottiglie di polietilene da 500 mL e conservati in frigorifero a 5 °C per la successiva caratterizzazione anionica e cationica e per la determinazione del *Chemical Oxygen Demand* (COD). La determinazione del COD è stata effettuata attraverso metodo colorimetrico (Colorimetro Smart 2 La Motte Company, COD Low Range Reagent Kit, 0 - 150  $\text{mg L}^{-1}$  COD, limite di rilevamento 0,5  $\text{mg L}^{-1}$ ). Le concentrazioni delle specie di anioni e cationi (anioni =  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ; cationi =  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ) sono state determinate attraverso Cromatografia Ionica Soppressa con detector a conducibilità utilizzando un cromatografo Dionex Series 4500i. Sono state utilizzate soluzioni standard (Fluka-TraceCERT® Standard Solutions, 1000  $\text{mg L}^{-1} \pm 4 \text{ mg L}^{-1}$ ) in acqua ultrapura (18.2 M $\Omega$  at 25 °C) per preparare opportuni standard di calibrazione. Le analisi sono state effettuate previa filtrazione dei campioni con filtri di cellulosa (0,2  $\mu\text{m}$ ) (Selvaggi et al., 2010).

### *Determinazione dei metalli pesanti nelle acque, nei sedimenti e nelle larve di chironomidi*

La concentrazione dei metalli pesanti (Cr, Cd, Cu, Ni, Zn, Pb) per i campioni del 2010/2011 è stata determinata mediante Spettrometria ad Assorbimento Atomico in fiamma (Perkin-Elmer 3300, limite strumentale di rilevazione 0,01-0,20  $\text{mg L}^{-1}$ ). Sono state utilizzate soluzioni standard (Fluka-

TraceCERT®, 1000 mg L<sup>-1</sup> ± 4 mgL<sup>-1</sup>) in acido nitrico al 2% per preparare appropriati standard di calibrazione.

La concentrazione dei metalli pesanti (Cr, Cd, Cu, Ni, Zn, Pb) per i campioni del 2012 è stata determinata mediante Spettroscopia di Emissione Ottica con Plasma Accoppiato Induttivamente (ICP-OES Ultima2, HORIBA Scientific, limite strumentale di rilevazione: 0,14-1,58 µg L<sup>-1</sup>) equipaggiato con un nebulizzatore ad ultrasuoni (CETAC Technologies, U-5000AT). Sono state utilizzate soluzioni standard (ICP multi-element standard solution IV CertiPUR®, VWR Merck Chemicals and Reagents, 1000 mg L<sup>-1</sup>) in acido nitrico per preparare appropriati standard di calibrazione.

I campioni di acqua sono stati acidificati con acido nitrico ultrapuro (Fluka, TraceSELECT®, per l'analisi di tracce ≥ 69%); mentre sui sedimenti e sulle larve di chironomidi è stata effettuata una digestione acida (MATT e APAT, 2005; Di Veroli et al., 2010, Türkmen e Ciminli, 2007). Tutte le misurazioni dei metalli pesanti nei sedimenti, nelle acque e nelle larve di chironomidi sono basate su due repliche.

I campioni di sedimento sono stati ottenuti dragando lo strato superficiale (ca. 5 cm) dei sedimenti del fondale con una draga manuale. I campioni (500 g) sono stati conservati in bottiglie di polietilene e congelati a -18 °C (MATT e APAT, 2005).

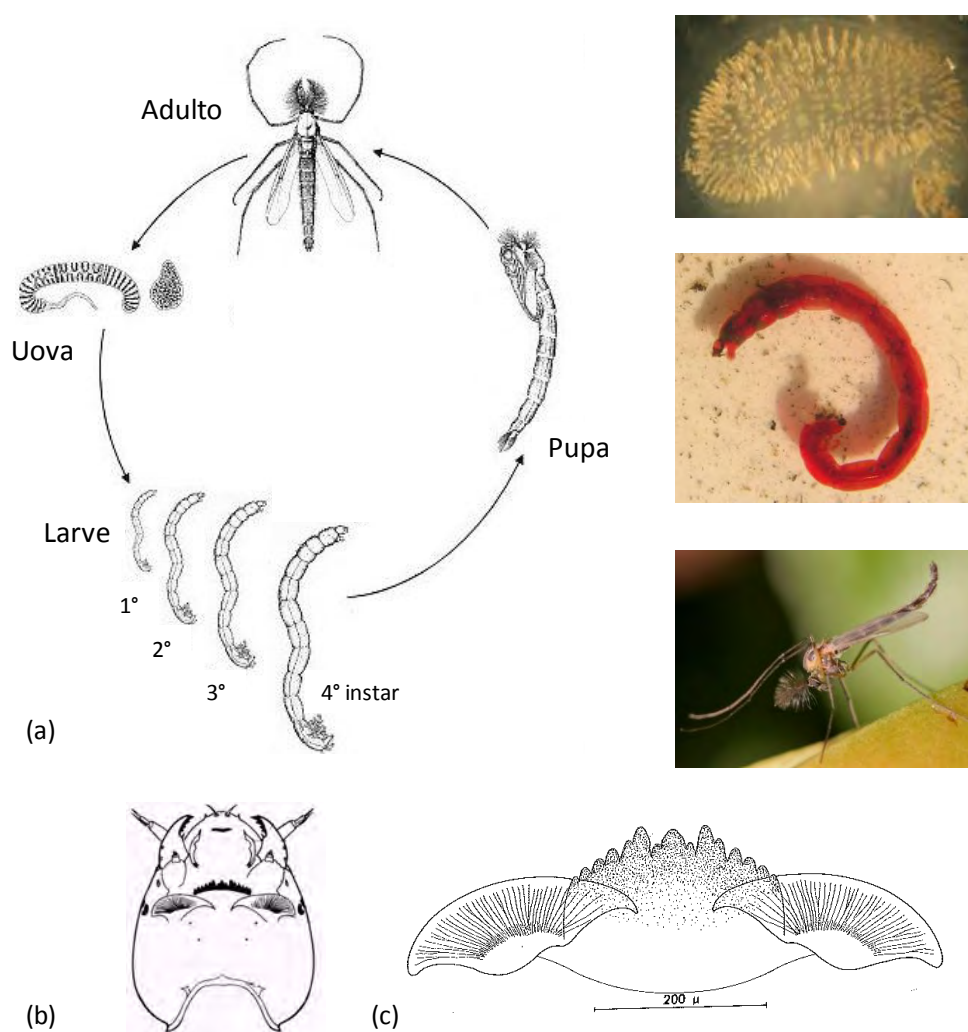
Tutti i campioni di sedimento sono stati essiccati all'aria, frantumati usando mortaio e pestello e fatti passare attraverso un setaccio con maglie di 2 mm, essiccati a 105°C per 24h e digeriti come segue: sono stati aggiunti al campione (2,0 g) 15 mL di acido nitrico ultrapuro concentrato (Fluka, TraceSELECT®, per l'analisi di tracce ≥ 69%) e la miscela è stata riscaldata a 160 °C per 1h; successivamente, il recipiente è stato raffreddato a temperatura ambiente e sono stati aggiunti 10 mL di acido cloridrico ultrapuro concentrato (Fluka, TraceSELECT®, per l'analisi di tracce ≥ 37%) e il recipiente è stato riscaldato a 160°C per 1h. La miscela è stata raffreddata, filtrata (filtri Whatman Grade No. 42, porosità 2.5 µm) e diluita con acqua ultrapura a 50 mL.

Le larve di *Chironomus riparius* sono state lavate con acqua bi-distillata e congelate a -18 °C in contenitori di vetro. Poi, circa 300/500 larve per stazione sono state prese e scongelate per la rimozione della capsula cefalica e per l'analisi delle malformazioni dell'apparato boccale. Le rimanenti parti dei corpi delle larve sono state raccolte e poste in stufa a 105 °C fino al raggiungimento di peso costante. La digestione dei tessuti larvali è stata effettuata attraverso digestione acida con acido nitrico ultrapuro concentrato: i campioni (0,5 g) sono stati riscaldati a 160 °C con HNO<sub>3</sub> (2,5 mL) per 1 h, poi i recipienti sono stati raffreddati a temperatura ambiente, e

quindi riscaldati nuovamente con acido nitrico 1 M (2 mL) fino a quasi secchezza. Dopo la digestione, i campioni sono stati filtrati (filtri Whatman Grade No. 42, porosità 2.5  $\mu\text{m}$ ) ed è stata aggiunta acqua ultrapura fino al raggiungimento del volume desiderato (25 mL).

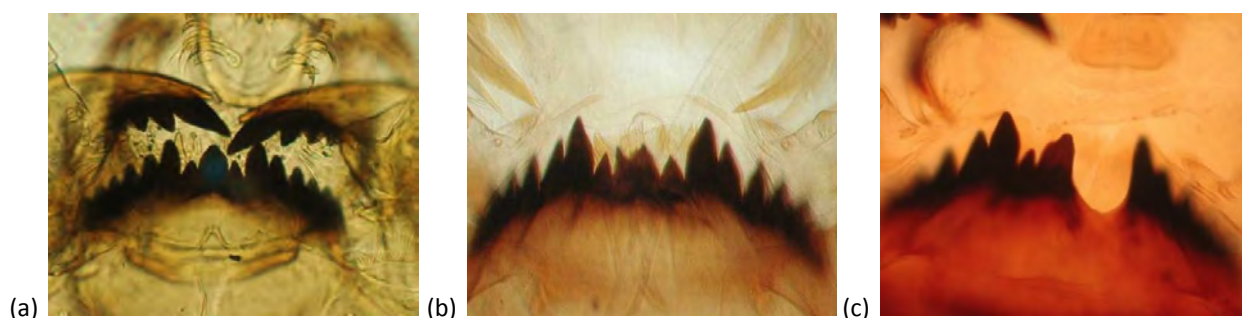
### *Malformazioni boccali delle larve di chironomidi*

*Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) è un organismo ampiamente utilizzato nei programmi di monitoraggio e nei test ecotossicologici (Ristola et al., 1999; De Haas et al., 2004; León Paumen et al., 2008; Di Veroli et al., 2012a, 2012b); sono disponibili per questa specie anche linee guide standard dell'OECD per la tossicità dei sedimenti (OECD, 2004). Le larve di chironomidi vivono a stretto contatto con i sedimenti delle acque dolci e si sviluppano in quattro stadi (Fig. 2.2). In questo studio abbiamo studiato le malformazioni morfologiche del *mentum* delle larve di chironomidi, appartenenti all'ultimo stadio (IV instar).



**Figura 2.2** - Ciclo vitale, capsula cefalica e *mentum* di *Chironomus riparius*.

Ogni individuo è stato classificato in base ad un protocollo di risposta morfologica (modificato da Janssens de Bisthoven et al., 1998; Di Veroli et al., 2010; Fig.2.3): classe 1 (CL. 1 - individui senza malformazioni morfologiche); classe 2 (CL. 2 - individui con malformazioni lievi); classe 3 (CL. 3 - individui con malformazioni gravi).



**Figura 2.3** - Esempi di *mentum* di *Chironomus riparius*: **(a)** individuo di classe 1 (senza malformazioni morfologiche); **(b)** individuo di classe 2 (individuo con malformazioni lievi); **(c)** individuo di classe 3 (individuo con malformazioni gravi).

### *Analisi statistiche*

Le differenze osservate nelle incidenze delle malformazioni sono state esplorate con il test del Chi quadrato ( $\chi^2$ ).

È stata utilizzata l'Analisi delle Componenti Principali (PCA), come tecnica di ordinamento, per stabilire associazioni tra i siti di campionamento ed i metalli pesanti (nei sedimenti, nei tessuti larvali e nelle acque).

È stato applicato l'indice di correlazione di Pearson per rivelare il grado di associazione tra la contaminazione da metalli (basato sulle Componenti Principali estratte dalla PCA), e l'incidenza delle malformazioni (valori percentuali trasformati in arcoseno) nei siti di campionamento.

Queste analisi sono state effettuate per la campagna del 2012 alle stazioni 1 - 4, mentre non sono state effettuate per la campagna esplorativa del 2010, a causa del ridotto numero di dati (monitoraggio dei metalli pesanti, solo nei sedimenti, e analisi delle malformazioni limitati alla stazione 4).

Tutte le analisi statistiche sono state effettuate attraverso il software R software (2.7.2) (R Development Core Team, 2008).

## 2.3 RISULTATI

L'indagine preliminare del sito di campionamento più compromesso (Stazione 4: 2010 - 2011) del Torrente Genna ha mostrato una condizione di forte alterazione dell'ambiente, soprattutto per quanto riguarda i parametri chimici e fisico-chimici delle acque, indicativi di un forte inquinamento organico, le alte concentrazioni di metalli pesanti nei sedimenti e l'alta incidenza di malformazioni nelle larve di *C. riparius* (IV instar). La campagna di campionamento attuale (Stazioni 1 - 4: 2012) ha confermato questo stato di degrado per l'intero corso d'acqua (Tab. 2.1, 2.2, 2.3).

I parametri chimici e fisico-chimici dei campioni di acqua hanno dimostrato che la condizione ambientale del Torrente Genna è caratterizzata da un forte inquinamento, come evidenziato da alti valori di conducibilità, COD, azoto (in particolare ammonio) e bassi valori di DO. Nel mese di Marzo e Ottobre 2012, la St. 1 era in secca (Tab. 2.1).

In totale 4875 larve di *C. riparius* (IV instar) (Tab. 2.2) sono state campionate durante l'intera indagine. L'incidenza delle malformazioni del *mentum* (CL. 2 + 3) era generalmente alta, circa il 56,2% (29,5% in CL. 3) con valori più alti alla Stazione 3 (64,7%), soprattutto a causa della maggiore incidenza di malformazioni gravi (40,1% in CL. 3). Nel 2012, le malformazioni lievi (CL. 2) hanno mostrato, ad eccezione della Stazione 3 (24,5%), valori costanti intorno al 31%.

Giugno ha presentato la più bassa incidenza di malformazioni (CL. 2 + 3) in tutte le stazioni, mentre Marzo il più alto, con valori medi rispettivamente del 48,2% (17,4% in CL. 3) e del 65,9% (38,1% in CL. 3 ). Il test del Chi-quadro (Stazioni 1-4, 2012) ha mostrato che le differenze osservate sono risultate statisticamente significative ( $\chi^2 = 327,56$ ,  $p < 0.01$ ) tra gli esemplari normali (CL. 1.), lievemente (CL. 2) e gravemente (CL. 3) malformati.

**Tabella 2.1** - Parametri chimici e fisico-chimici delle acque presso le stazioni di campionamento St. 1 - 4 (2010 - 2011) e St. 4 (2010 - 2011) del Torrente Genna; " --- " , in secca.

St	Data	Largh.	Prof.	T. acq.	Cond.	pH	DO	COD	F <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	Br <sup>-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Li <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>+2</sup>	Ca <sup>+2</sup>
		m	m	°C	µS cm <sup>-1</sup>		mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>
4	Mag 2010	7,00	0,40	15,00	771	8,16	8,50	8,00	3,43	40,77	<0,1	n.d.	51,16	1,29	31,10	2,55	<0,5	33,65	3,89	15,88	144,02
4	Ago. 2010	8,00	0,50	21,40	783	7,73	4,30	16,00	0,65	71,76	<0,1	3,92	45,97	3,91	25,46	5,30	<0,5	58,29	9,01	10,49	99,89
4	Ott. 2010	6,00	0,30	15,20	881	7,88	4,90	31,00	6,94	95,96	<0,1	5,48	46,70	<0,1	66,81	8,02	<0,5	68,23	12,03	12,48	104,02
4	Feb. 2011	6,00	0,30	5,40	815	8,16	8,20	13,00	0,43	68,48	<0,1	0,90	56,60	1,01	37,55	7,59	<0,5	48,87	6,83	16,55	125,16
	Media	6,75	0,38	14,25	813	7,98	6,48	17,00	2,86	69,24	<0,1	3,43	50,10	1,58	40,23	5,86	<0,5	52,26	7,94	13,85	118,27
1	Mar. 2012																				
1	Giu. 2012	3,50	0,15	20,30	880	7,20	1,20	61,00	0,44	105,54	<0,1	2,42	14,39	<0,1	0,77	4,39	<0,5	66,42	6,23	12,59	113,82
1	Ott. 2012																				
2	Mar. 2012	5,00	0,30	12,70	909	8,17	5,00	80,00	0,32	93,19	<0,1	4,78	45,63	2,90	5,74	17,66	<0,5	72,26	16,53	12,12	102,85
2	Giu. 2012	5,00	0,30	20,50	955	7,61	1,30	42,50	0,20	113,14	<0,1	7,84	52,64	<0,1	2,80	9,91	<0,5	77,58	11,64	11,66	106,00
2	Ott. 2012	5,50	0,35	18,10	1022	7,73	2,10	19,50	0,20	110,16	<0,1	7,05	47,99	2,21	25,85	8,41	<0,5	77,50	11,87	13,53	109,76
	Media	5,17	0,32	17,10	962	7,84	2,80	47,33	0,24	105,49	<0,1	6,56	48,75	1,74	11,46	11,99	<0,5	75,78	13,34	12,44	106,21
3	Mar. 2012	4,50	0,20	11,60	700	7,88	5,10	64,50	0,51	77,71	<0,1	2,83	30,93	1,85	5,66	11,56	<0,5	54,93	8,96	8,57	83,63
3	Giu. 2012	4,50	0,20	22,70	969	7,77	2,20	35,00	0,60	106,36	<0,1	6,31	43,30	<0,1	2,13	14,46	<0,5	77,04	12,96	11,69	107,17
3	Ott. 2012	5,00	0,30	16,10	994	7,92	3,70	25,50	0,23	95,91	<0,1	6,06	49,27	<0,1	10,77	10,93	<0,5	73,01	13,16	13,41	103,04
	Media	4,67	0,23	16,80	888	7,86	3,67	41,67	0,44	93,33	<0,1	5,07	41,17	0,68	6,19	12,32	<0,5	68,32	11,69	11,22	97,95
4	Mar. 2012	6,50	0,35	10,10	739	7,97	4,80	67,50	0,33	85,32	<0,1	4,87	31,59	2,44	3,32	13,35	<0,5	59,77	10,52	9,75	84,88
4	Giu. 2012	6,00	0,30	23,60	996	7,75	1,90	44,50	0,75	125,43	<0,1	8,18	42,19	<0,1	6,23	14,25	<0,5	78,32	13,74	11,83	125,91
4	Ott. 2012	6,00	0,30	15,30	1018	7,97	4,50	26,50	0,61	104,70	<0,1	5,95	52,09	<0,1	17,43	11,53	<0,5	80,70	13,07	13,25	118,01
	Media	6,17	0,32	16,33	918	7,90	3,73	46,17	0,56	105,15	<0,1	6,33	41,96	0,88	8,99	13,04	<0,5	72,93	12,44	11,61	109,60



**Tabella 2.2** - Incidenza delle classi di malformazioni morfologiche delle larve di *C. riparius* delle stazioni 1 - 4 (2012) e della St. 4 (2010 - 2011) del Torrente Genna (CL.1 - esemplari senza alcuna malformazione morfologica, CL.2 - esemplari con malformazioni lievi, CL.3 - esemplari con malformazioni gravi); "---", in secca.

St	Data	CL.1	CL.2	CL.3	Tot.	%CL.(2+3)	%CL.3
4	Giu. 2010	245	42	23	310	20,97	7,42
4	Ago. 2010	162	60	71	293	44,71	24,23
4	Ott. 2010	88	67	153	308	71,43	49,68
4	Feb. 2011	113	69	128	310	63,55	41,29
	Tot.	608	238	375	1221	50,20	30,71
1	Mar. 2012	---	---	---	---	---	---
1	Giu. 2012	146	93	64	303	51,82	21,12
1	Ott. 2012	---	---	---	---	---	---
2	Mar. 2012	195	148	155	498	60,84	31,12
2	Giu. 2012	174	94	26	294	40,82	8,84
2	Ott. 2012	147	105	54	306	51,96	17,65
	Tot.	516	347	235	1098	53,01	21,40
3	Mar. 2012	110	112	271	493	77,69	54,97
3	Giu. 2012	175	88	45	308	43,18	14,61
3	Ott. 2012	106	71	128	305	65,25	41,97
	Tot.	391	271	444	1106	64,65	40,14
4	Mar. 2012	203	155	140	498	59,24	28,11
4	Giu. 2012	133	100	77	310	57,10	24,84
4	Ott. 2012	127	90	92	309	58,90	29,77
	Tot.	463	345	309	1117	58,55	27,66

Durante l'anno 2012, le concentrazioni medie di Cd, Cr e Ni nei sedimenti sono state più alte alla St. 4, quelle di Zn e Cu alla St. 3, e quelle di Pb alla St. 2. Nei tessuti larvali le concentrazioni medie più elevate sono state rilevate alla St. 4 per tutti i metalli ad eccezione del Ni (St. 3). Nelle acque le concentrazioni medie più elevate sono state trovate alla St. 2 tranne che per lo Zn (St. 4).

Nei sedimenti le concentrazioni medie di Cd, Zn e Cu erano più alte a Marzo, quelle di Cr e Ni ad Ottobre e quelle di Pb nel mese di Giugno. Nei tessuti larvali le concentrazioni medie più alte sono state trovate nel mese di Giugno per tutti i metalli ad eccezione dello Zn (Ottobre). Nelle acque le concentrazioni medie più elevate di metalli sono state rilevate nel mese di Giugno.

I valori di riferimento TEC (Threshold Concentration Effect) e PEC (Probable Effect Concentration) sono stati usati per predire la tossicità da metalli pesanti dei sedimenti, secondo le linee guida di qualità dei sedimenti (SQG, Mac Donald et al., 2000).

Le concentrazioni di Cd misurate nei sedimenti del Torrente Genna, erano sempre superiori al valore di riferimento TEC, tranne nel Giugno 2010 (campionamento esplorativo) alla St. 4. Il Cd superava il valore PEC solo nell'Ottobre 2010 (campionamento esplorativo) alla St. 4. Il Pb superava il valore TEC in Agosto e Ottobre 2010 alla St. 4 e nel Giugno 2012 alle St. 1 e 2. Le concentrazioni di Ni superavano sempre il valore TEC tranne a Marzo e Giugno 2012 alla St. 2.

I valori di Cu superavano il TEC a Giugno 2012 alla St. 1, e a Marzo e Giugno 2012 alla St. 3. Zn e Cr non superavano mai i valori TEC (Tab. 2.3).

Infine, nel 2012, la concentrazione media dei metalli pesanti nei sedimenti per ogni stazione non ha mai superato la soglia del PEC, mentre la soglia del TEC è stata superata per il Cd in tutte le stazioni, per il Ni alle St. 3 e 4, e per il Cu alla St. 3.

**Tabella 2.3** - Metalli pesanti (cadmio, piombo, zinco, cromo, nichel e rame) nei sedimenti, acqua e tessuti larvali delle stazioni 1 - 4 (2012) e della St. 4 (2010 - 2011) del Torrente Genna; "---", in secca. TEC (Threshold Effect Concentration), PEC (Probable Effect Concentration) da MacDonald et al., 2000.

St	Data	Sedimenti (mg Kg <sup>-1</sup> )						Tessuti larvali (mg Kg <sup>-1</sup> )						Acqua (µg L <sup>-1</sup> )					
		Cd	Pb	Zn	Cr	Ni	Cu	Cd	Pb	Zn	Cr	Ni	Cu	Cd	Pb	Zn	Cr	Ni	Cu
4	Giu. 2010	0,75	19,43	71,37	19,47	34,95	14,70												
4	Ago. 2010	1,30	49,38	79,31	16,47	33,19	27,18												
4	Ott. 2010	5,66	36,18	109,60	26,57	38,03	27,14												
4	Feb. 2011	1,89	28,24	90,80	16,83	35,72	23,35												
	Media	2,40	33,31	87,77	19,84	35,47	23,09												
1	Mar. 2012	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
1	Giu. 2012	3,69	53,81	90,60	22,88	31,71	40,44	1,42	2,72	278,20	10,83	36,81	17,51	10,28	6,23	24,71	4,75	14,84	0,14
1	Ott. 2012	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2	Mar. 2012	2,96	25,68	68,12	14,22	18,55	24,84	0,52	1,48	274,55	7,86	5,74	20,38	8,98	5,33	106,26	4,38	9,80	5,49
2	Giu. 2012	2,49	47,95	72,14	16,44	21,66	24,64	1,07	1,59	213,27	5,72	26,52	15,75	10,33	15,99	136,84	7,56	15,85	31,24
2	Ott. 2012	3,05	31,57	81,86	29,78	22,83	24,88	0,92	2,58	289,72	4,38	5,44	11,88	10,23	5,37	44,38	4,63	10,51	0,65
	Media	2,84	35,07	74,04	20,15	21,01	24,79	0,84	1,88	259,18	5,99	12,57	16,00	9,85	8,90	95,83	5,52	12,05	12,46
3	Mar. 2012	3,66	23,80	95,85	22,52	24,26	40,53	0,41	1,10	232,63	2,24	2,00	15,04	8,86	4,55	26,46	4,50	10,24	3,49
3	Giu. 2012	2,24	33,73	91,55	16,60	22,76	34,16	1,49	5,73	216,64	7,93	34,03	26,89	10,02	12,85	35,22	5,28	11,22	2,04
3	Ott. 2012	2,37	21,84	75,95	15,28	23,69	20,60	1,25	6,78	228,93	6,26	10,07	33,46	9,86	4,91	42,55	4,76	11,55	0,57
	Media	2,76	26,46	87,78	18,13	23,57	31,77	1,05	4,54	226,06	5,48	15,37	25,13	9,58	7,44	34,75	4,85	11,00	2,03
4	Mar. 2012	3,89	22,31	102,91	25,65	30,55	28,34	0,36	1,73	225,57	2,56	2,74	16,16	8,86	4,14	23,46	4,59	10,38	6,01
4	Giu. 2012	4,37	25,99	62,78	26,17	35,64	19,85	2,27	10,53	363,89	11,95	16,65	34,71	10,14	9,25	242,34	4,96	12,34	0,14
4	Ott. 2012	3,84	28,92	78,92	36,02	42,90	22,95	1,43	4,91	387,58	8,26	11,09	25,41	9,84	5,59	45,62	5,02	12,47	1,23
	Media	4,03	25,74	81,54	29,28	36,36	23,71	1,35	5,73	325,68	7,59	10,16	25,43	9,61	6,33	103,81	4,86	11,73	2,46
	TEC	0,99	35,8	121	43,4	22,7	31,6												
	PEC	4,98	128	459	111	48,6	149												

I BSAF (Biota to Sediment Accumulation Factor: rapporto tra la concentrazione di metallo nei tessuti e quella nei sedimenti) nelle larve di *C. riparius* erano > 1 per lo Zn (tutti i campioni), per Ni (Giugno 2012, St. 1 - 3) e per il Cu (Ottobre 2012, St. 3 e 4; Giugno 2012, St. 4). Il BSAF per il Torrente Genna era metallo-specifico, con Zn e Cu che mostravano sempre i fattori di accumulo più alti e il Pb sempre al limite inferiore della serie. In particolare, per quanto riguarda le stazioni, il BSAF diminuiva come segue: St. 2: Zn > Cu > Ni > Cr > Cd > Pb; St. 3: Zn > Cu > Ni > Cd > Cr > Pb; St. 4: Zn > Cu > Cd > Ni > Cr > Pb; per quanto riguarda le stagioni, il BSAF diminuiva come segue: Giugno: Zn > Cu, Ni > Cd > Cr > Pb; Marzo: Zn > Cu > Cr > Ni > Cd > Pb; Ottobre: Zn > Cu > Cd > Ni > Cr > Pb (Tab. 2.4).

**Tabella 2.4** - BSAF (*Biota to Sediment Accumulation Factor*) nelle larve di *Chironomus riparius*; "---", in secca.

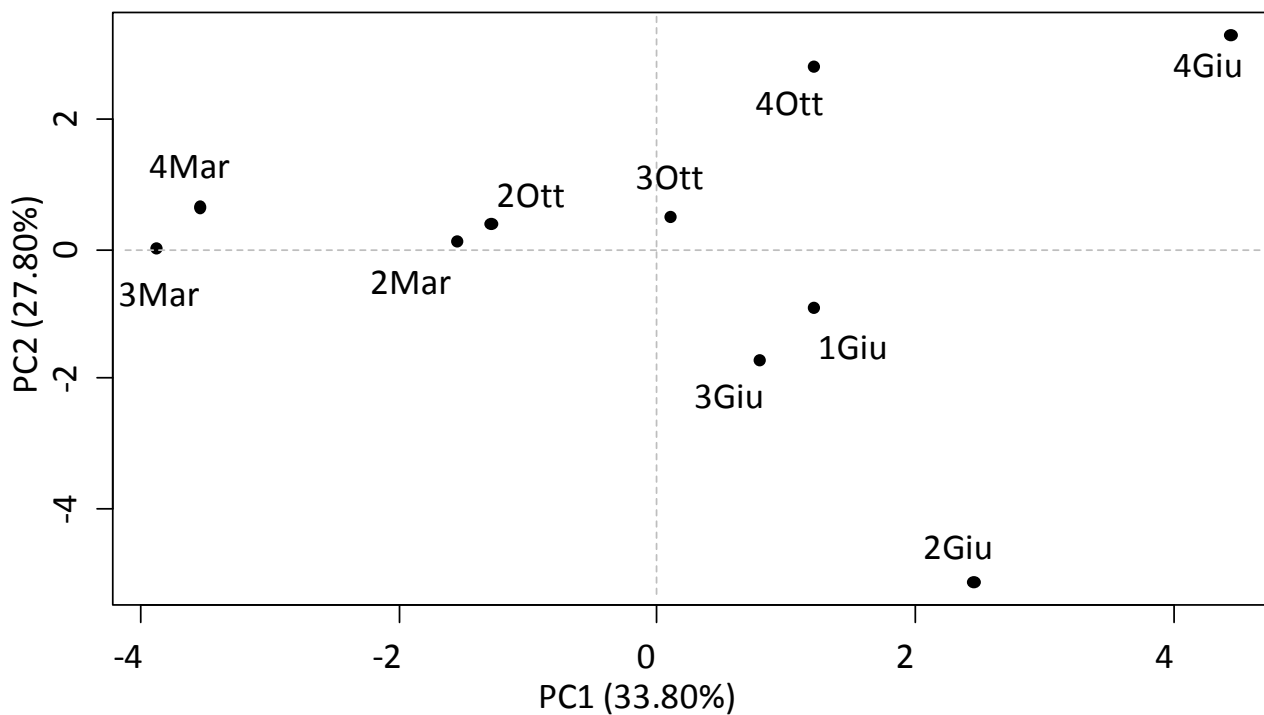
	BSAF	Cd	Pb	Zn	Cr	Ni	Cu
1 Mar. 2012	---	---	---	---	---	---	---
1 Giu. 2012	0,38	0,1	3,1	0,5	1,2	0,43	
1 Ott. 2012	---	---	---	---	---	---	---
2 Mar. 2012	0,2	0,1	4,0	0,6	0,3	0,8	
2 Giu. 2012	0,4	0,0	3,0	0,3	1,2	0,6	
2 Ott. 2012	0,3	0,1	3,5	0,1	0,2	0,5	
Media	0,30	0,06	3,51	0,35	0,59	0,65	
3 Mar. 2012	0,1	0,0	2,4	0,1	0,1	0,4	
3 Giu. 2012	0,7	0,2	2,4	0,5	1,5	0,8	
3 Ott. 2012	0,5	0,3	3,0	0,4	0,4	1,6	
Media	0,44	0,18	2,60	0,33	0,67	0,93	
4 Mar. 2012	0,09	0,08	2,19	0,10	0,09	0,57	
4 Giu. 2012	0,52	0,41	5,80	0,46	0,47	1,75	
4 Ott. 2012	0,37	0,17	4,91	0,23	0,26	1,11	
Media	0,33	0,22	4,30	0,26	0,27	1,14	

La PCA effettuata sui metalli nei sedimenti, nelle acque e nei tessuti larvali ha permesso di analizzare il livello di contaminazione dovuto ai metalli pesanti nelle stazioni del Torrente Genna durante il 2012.

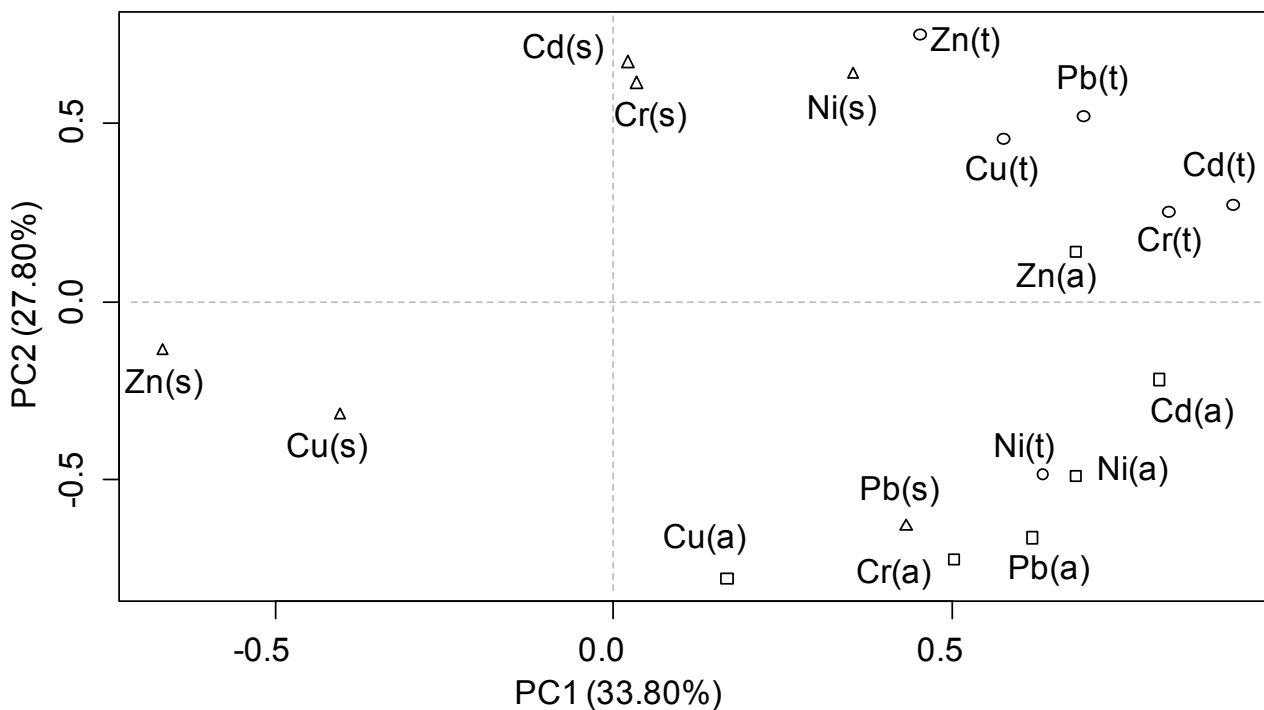
La PC1 (33,80%) ha mostrato un gradiente stagionale, dove Marzo e Giugno sono posti rispettivamente sul lato sinistro e destro dell'asse. Nel mese di Marzo, le stazioni sono associate principalmente ai metalli pesanti nei sedimenti, in particolare Zn e Cu, mentre nel mese di Giugno le stazioni sono associate ai metalli nelle acque e nei tessuti larvali. Nel mese di Ottobre, le stazioni sono in una posizione intermedia.

La PCA nella PC2 (27,80%) ha mostrato un gradiente in parte riflettente il profilo longitudinale del Torrente Genna per ogni stagione, in cui la stazione più a valle (St. 4) è collocata nella parte alta della PC2 ed è principalmente associata a Cd, Ni e Cr dei sedimenti ed a Zn, Pb e Cu dei tessuti larvali. Le restanti stazioni (in particolare a Giugno) sono collocate sulla parte inferiore della Dim 2 e sono principalmente caratterizzate dai metalli Cu, Cr, Pb, Ni delle acque, da Pb dei sedimenti e da Ni dei tessuti larvali (Fig. 2.4).

(a)



(b)



**Figura 2.4** - PCA (primi due assi) effettuate sui metalli pesanti (Cr, Ni, Cu, Zn, Cd e Pb) nei diversi compartimenti: sedimenti (s), acqua (a), e tessuti larvali (t), presso le stazioni di campionamento del Torrente Genna nel corso del 2012; **(a)**, siti di campionamento; **(b)**, metalli pesanti nei diversi compartimenti.

Non è stata osservata nessuna correlazione significativa tra le PC (Dim 1 e 2), estratte dalla PCA, e le classi di malformazioni morfologiche di *C. riparius* (valori percentuali trasformati in arcoseno), né tra i metalli pesanti singoli nei diversi compartimenti (sedimenti, tessuti larvali e acque) e le malformazioni (Tab. 2.5).

**Tabella 2.5 - (a)** La correlazione tra il grado di contaminazione da metalli pesanti, basato sulle PC estratte dalla PCA, e l'incidenza delle malformazioni (CL) (valori percentuali trasformati in arcoseno); Dim 1 e Dim 2, primi due assi della PCA; r, coefficiente di correlazione di Pearson; p, valore di probabilità. **(b)** Correlazione tra il grado di contaminazione dei singoli metalli pesanti nei diversi compartimenti (sedimenti, tessuti larvali e acqua) e l'incidenza delle malformazioni (CL.) (valori percentuali trasformati in arcoseno); r, coefficiente di correlazione di Pearson; p, valore di probabilità.

Metalli pesanti: tossicità totale			
PC	Malformazione	r	p
PC1	CL. 2	0,368	0,295
PC1	CL. 3	-0,542	0,105
PC1	CL. 2+3	-0,570	0,086
PC2	CL. 2	-0,055	0,880
PC2	CL. 3	0,504	0,138
(a) PC2	CL. 2+3	0,522	0,122

Metalli pesanti:		Sedimenti		Tessuti larvali		Acqua	
	Malformazione	r	p	r	p	r	p
	Cd CL. 2	0,208	0,564	0,234	0,515	0,436	0,208
	Cd CL. 3	0,293	0,411	-0,346	0,327	0,570	0,030
	Cd CL. 2+3	0,387	0,270	-0,390	0,265	-0,701	0,024
	Pb CL. 2	0,401	0,251	-0,001	0,998	0,298	0,403
	Pb CL. 3	-0,658	0,039	-0,026	0,944	-0,735	0,015
	Pb CL. 2+3	-0,657	0,039	-0,082	0,822	-0,756	0,011
	Zn CL. 2	-0,231	0,521	0,323	0,363	0,380	0,279
	Zn CL. 3	0,191	0,597	0,036	0,922	-0,263	0,463
	Zn CL. 2+3	0,176	0,626	0,080	0,826	-0,204	0,086
	Cr CL. 2	0,329	0,353	0,290	0,416	0,258	0,472
	Cr CL. 3	0,041	0,911	-0,315	0,375	-0,643	0,045
	Cr CL. 2+3	0,116	0,749	-0,359	0,308	-0,639	0,086
	Ni CL. 2	0,153	0,673	0,222	0,538	0,277	0,438
	Ni CL. 3	0,072	0,842	-0,638	0,047	-0,553	0,086
	Ni CL. 2+3	0,080	0,826	-0,712	0,021	-0,564	0,090
	Cu CL. 2	-0,284	0,426	-0,271	0,448	0,215	0,551
	Cu CL. 3	0,163	0,653	0,150	0,680	-0,477	0,163
(b)	Cu CL. 2+3	0,151	0,677	0,048	0,895	-0,439	0,204

## 2.4 DISCUSSIONE

Lo studio delle relazioni tra queste malformazioni e la contaminazione da metalli in condizioni naturali ha permesso di caratterizzare la contaminazione da metalli nel Torrente Genna, e di dimostrare che le malformazioni dell'apparato boccale delle larve di *C. riparius* sono un *endpoint* di tossicità.

La contaminazione del torrente appare essere correlata allo scarico della zona sud-ovest della città di Perugia (circa 150000 abitanti). Inoltre, verso valle, parte del bacino del Torrente Genna è soggetto ad allevamenti suinicoli intensivi (circa 80 allevamenti), che contribuiscono (attraverso fertirrigazione agricola) all'inquinamento da metalli (ad eccezione del piombo) dalla St. 2 alla confluenza con il Fiume Nestore (St.4), spiegando così l'incremento di zinco e rame alla St. 3, e di cadmio, cromo, nichel e zinco alla St. 4.

Le malformazioni boccali delle larve di *C. riparius* osservate nel presente lavoro, sono risultate essere un efficiente *endpoint* di valutazione della tossicità nel Torrente Genna, perché più della metà (56%) della larve di *C. riparius* esaminate (circa 5000) erano malformate (CL. 2 + 3). Questo risultato riflette l'alto livello di contaminazione da metalli pesanti del corso d'acqua (sedimenti in particolare), e conferma i precedenti studi di laboratorio, nei quali era stato provato che le malformazioni boccali risultavano essere efficaci bioindicatori di stress ambientale (Martinez et al., 2002; Di Veroli et al., 2012b).

Al contrario, il tasso naturale di malformazione, calcolato su popolazioni di chironomidi di ambienti non contaminati o con modesto carico inquinanti, è risultato al di sotto del 10% (Wiederholm, 1984; Warwick, 1985; Madden et al., 1992; Bird, 1994; Di Veroli et al., 2012a).

Nonostante il grande numero di studi sulle malformazioni dei chironomidi, una chiara relazione dose-risposta è stata stabilita soltanto per poche sostanze chimiche, in particolare metalli pesanti (Kosawalt e Knight, 1987; Vermeulen et al., 2000). In condizioni sperimentali, le malformazioni dei chironomidisono state indotte con l'esposizione a singoli metalli, come cadmio, rame, piombo e zinco (Van de Guchte van Urk, 1989; Michailova e Belcheva, 1990; Bird et al., 1995; Janssens de Bisthoven et al., 2001; Martinez et al., 2003) e con l'esposizione a miscele di metalli (Di Veroli et al., 2012b).

Nel presente studio, tra i metalli pesanti esaminati in condizioni naturali nei differenti compartimenti (sedimenti, tessuti larvali e acque), solo i metalli nei sedimenti, in particolare rame e zinco, hanno mostrato un'associazione con le stazioni campionate in Marzo, in cui le

malformazioni (CL. 2 + 3: 66%) erano prevalenti, in particolare quelle gravi (CL. 3: 38%). Inoltre, in questo mese, le concentrazioni medie di Cu e Zn nei sedimenti erano più alte (rispettivamente 31,1 e 89,0 mg/kg<sup>-1</sup>) rispetto agli altri mesi. Al contrario, i metalli pesanti nelle acque (un compartimento molto dinamico) e nei tessuti larvali, hanno mostrato un'associazione con le stazioni campionate in Giugno, mese in cui le malformazioni (CL. 2 + 3: 48%) non erano prevalenti, perché quelle gravi erano ridotte (CL. 3: 17%). Di conseguenza, le malformazioni riflettevano principalmente la contaminazione da metalli pesanti nei sedimenti più che la contaminazione nei tessuti larvali e/o nell'acqua.

Questi risultati degli effetti dei metalli pesanti esaminati nei differenti compartimenti (sedimenti, tessuti larvali e acque) sono in accordo con le precedenti indagini effettuate in condizioni controllate, dove le correlazioni significative tra le malformazioni e le concentrazioni di metalli sono state osservate solo per sedimenti contaminati artificialmente, ma non per i tessuti larvali (Di Veroli et al., 2012b). In particolare, i test di laboratorio indicavano una diretta dipendenza della gravità delle malformazioni con le concentrazioni dei metalli pesanti nei sedimenti.

Le concentrazioni dei metalli nei tessuti larvali di *C. riparius* non sono correlate con quelle dei sedimenti e con le malformazioni, molto probabilmente perché le funzioni fisiologiche e metaboliche e le condizioni ambientali influenzano la bio-disponibilità dei metalli, come similmente osservato in molte altre specie di macroinvertebrati (Bervoets et al., 1997; Besser et al., 2008; Desrosiers et al., 2008; Faria et al., 2008; Péry et al., 2008).

I processi di bioaccumulo in *C. riparius* sono risultati equamente omogenei lungo il Torrente Genna, come mostrato da trend simili di BSAF per i sei metalli pesanti nelle diverse stazioni e mesi. In particolare, zinco e rame (micro-elementi essenziali, tossici solo nel caso che superino certe soglie) erano sempre i metalli con i più alti tassi di bioaccumulo, mentre il piombo aveva il minore. Nonostante l'alta incidenza di malformazioni rilevate nel Torrente Genna (in particolare quelle gravi, CL. 3: circa 30%), la correlazione tra i metalli pesanti nei sedimenti e le malformazioni non è risultata essere significativa. Sembra accettabile che l'assenza di tale correlazione possa essere dovuta alla presenza di una miscela di inquinanti, inclusi composti minerali e composti organici, che contribuiscono all'incidenza delle malformazioni larvali di *C. riparius* nel Torrente Genna (Di Veroli et al., 2012b).

I risultati suggeriscono che la causa principale delle malformazioni morfologiche sia dovuta all'effetto sinergico di una miscela di composti tossici, più che da un singolo contaminante, in

accordo con precedenti studi effettuati in condizioni naturali e sperimentali (Vermeulen, 1995; Martinez et al., 2003; Di Veroli et al., 2010, 2012a, 2012b).



## 2.5 CONCLUSIONI

Questo studio di campo conferma che l'alta concentrazione di metalli pesanti (in particolare rame e zinco) nei sedimenti svolge un ruolo centrale nei confronti delle malformazioni morfologiche, principalmente di quelle gravi, osservate nelle larve di chironomidi.

Questi dati sono in accordo con i precedenti test sperimentali e sottolineano che le malformazioni dell'apparato boccale dei chironomidi rappresentano un effettivo endpoint per i programmi di monitoraggio delle acque dolci per valutare gli effetti tossici dei contaminanti, come i metalli pesanti.

*Chironomus riparius* è una specie tollerante capace di sopravvivere in siti contaminati chimicamente e colonizza con successo sistemi d'acqua dolce che ricevono alti carichi di materia organica. A questo riguardo, questa specie rappresenta un valido bioindicatore da usare in ambienti particolarmente inquinati, come quelli soggetti all'afflusso di acque di scarico derivate da allevamenti zootecnici.

La rilevazione della presenza dei metalli pesanti, tra i più comuni inquinanti ambientali, nei sedimenti fluviali può essere di grande importanza per la salute umana e ambientale (Graney e Eriksen, 2004; Singh et al., 2005; Liu et al., 2009). In effetti, l'impatto ecologico dei metalli può essere cruciale a causa della loro tossicità (ognuno di loro ha diversi effetti tossici), persistenza, e non-degradabilità nell'ambiente (Luoma, 1983; De Souza et al., 1986; Lacerda et al., 1992; Allen e Hansen, 1996).

Infine, il presente studio mette in luce l'importanza della valutazione degli effetti tossici della contaminazione negli ecosistemi d'acqua dolce, portando avanti, in parallelo, indagini con l'aiuto di saggi di laboratorio, per una migliore comprensione degli effetti dell'inquinamento ambientale sul biota.

## 2.6 RING TEST DELL'ANALISI DELLE MALFORMAZIONI DI CHIRONOMIDI

L'Università di Jyväskylä (Johanna Salmelin, University of Jyväskylä, Department of Biological and Environmental Science) in collaborazione con l'Istituto per l'Ambiente Finlandese (SYKE) ha organizzato un *ring test* sulle malformazioni dell'apparato boccale (*mentum*) delle larve di *Chironomus* spp.

Questo *ring test* ha coinvolto 22 team di esperti internazionali che hanno pubblicato articoli in riviste scientifiche sulle malformazioni dei chironomidi.

Gli scopi del ring test sono stati quelli di:

- 1) Verificare il grado di accordo tra i diversi gruppi di lavoro nella valutazione delle malformazioni del *mentum*;
- 2) migliorare la coerenza dell'analisi delle malformazioni individuando i tipi di anomalie che creano possibile disaccordo tra i valutatori;
- 3) predisporre sistemi di procedure automatizzate (analisi computerizzata delle immagini basata su fotografie microscopiche EDF - Extended Depth of Focus - Profondità Estesa di Messa a Fuoco) per sviluppare dei metodi standard di riconoscimento per l'identificazione delle malformazioni.

I risultati, in particolare le incongruenze eventualmente individuate tra gli esperti, saranno pertanto utilizzate anche per lo sviluppo di linee guida standard (CEN TC230 WG2 TG1) per l'identificazione delle malformazioni morfologiche delle larve di chironomidi. I risultati saranno anche pubblicati in una rivista scientifica.

Il materiale del test consisteva di 211 fotografie microscopiche EDF di *mentum* di larve di *Chironomus* spp. raccolti nel lago finlandese Saimaa (esempio in Figura 2.5). La tecnica EDF prevede la combinazione delle fotografie scattate a diversi livelli di messa a fuoco (Z-series) con un grande miglioramento della chiarezza. 154 larve appartenevano a un sito di riferimento a monte di una fonte di inquinamento locale, una fabbrica per la lavorazione della carta e materiale legnoso; 57 larve erano state raccolte da un sito fortemente inquinato immediatamente a valle di questa fonte di inquinamento.

Lo stesso materiale è stato inviato a tutti i partecipanti per essere valutato esplicitamente come normale o deformato.



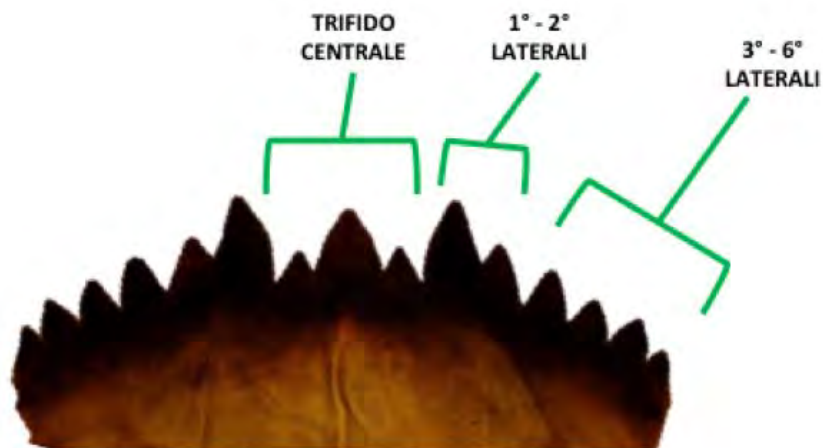
**Figura 2.5** - Esempio di fotografia microscopica EDF di un *mentum* di *Chironomus* spp.

#### *Calibrazione del metodo di identificazione delle malformazioni*

I risultati del *ring test* sono un primo passo per calibrare e standardizzare il metodo di identificazione e di classificazione delle malformazioni da parte di tutti i gruppi internazionali.

Su 211 *mentum*, 30 sono stati identificati come malformati dalla maggioranza degli esperti e in questo caso, la nostra identificazione era in accordo per il 100%.

Nel caso invece dei 180 *mentum* identificati come normali dalla maggioranza dei team, si è rilevata una certa difformità di giudizio che dovrà essere analizzata per alcune decine di casi. Il dente trifido centrale e i primi due denti laterali di ogni lato (Fig. 2.6) costituiscono le parti del *mentum* che sono state più spesso oggetto di discordanza. In particolare le malformazioni di questi settori del *mentum* riguardano la presenza di una punta sul dente centrale trifido e aspetti morfologici quali limatura, seghettatura e arrotondamento (Fig. 2.7, 2.8, 2.9, 2.10).



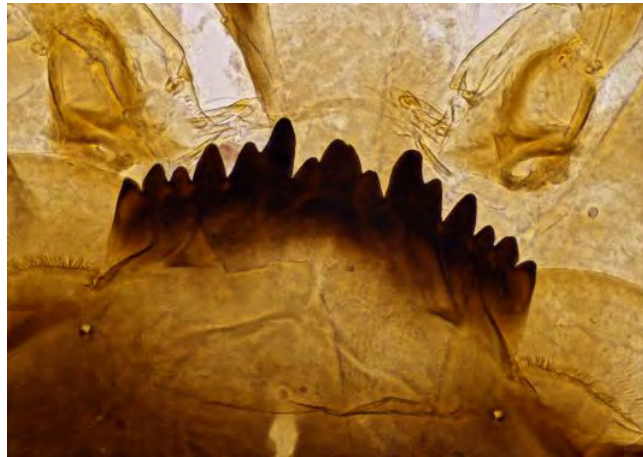
**Figura 2.6** - Struttura del *mentum* di *Chironomus*.



**Figura 2.7** - Esempio di *mentum* con dente centrale definito da noi "con punta", identificato quindi come malformato, ma che dalla maggioranza degli esperti viene identificato come normale.



**Figura 2.8** - Esempio di *mentum* con dente centrale e primo dente laterale destro definiti da noi "limati", identificato quindi come malformato, ma che dalla maggioranza degli esperti viene identificato come normale.



**Figura 2.9** - Esempio di *mentum* con dente centrale definiti da noi “seghettato”, identificato quindi come malformato, ma che dalla maggioranza degli esperti viene identificato come normale.



**Figura 2.10** - Esempio di *mentum* con denti definiti da noi “arrotondati”, identificato quindi come malformato, ma che dalla maggioranza degli esperti viene identificato come normale.

In generale quindi, il nostro metodo di valutazione è risultato essere di norma più severo. In effetti il protocollo standard utilizzato (modificato secondo Janssens De Bisthoven et al., 1998) prevede una suddivisione delle malformazioni del *mentum* in lievi (CL. 2) e in gravi (CL. 3), mentre nel caso del *ring test* il protocollo consisteva in una identificazione binaria: normale (0) o malformato (1).

# 3

## BIOACCUMULO DEI METALLI PESANTI NEL GAMBERO ROSSO DELLA LOUISIANA

I metalli pesanti sono tra gli inquinanti più frequenti che si ritrovano nei sedimenti fluviali. In effetti, i sedimenti costituiscono un habitat per la comunità bentonica, ma anche una riserva per i comuni contaminanti. Il presente studio, svolto in un'area industriale dell'Italia Centrale, ha analizzato il bioaccumulo dei metalli pesanti (Cd, Cu, Pb, Cr, Zn e Ni) nei tessuti di *Procambarus clarkii*, un gambero utilizzato come bioindicatore per l'inquinamento da metalli pesanti nei sistemi d'acqua dolce. Come è ben noto, l'epatopanca (tessuto di detossificazione) del gambero rosso della Louisiana ha mostrato le più alte concentrazioni di metalli rispetto alla muscolatura addominale (tessuto non detossificante). Questa relazione tra i due tipi di tessuto può essere anche espressa dal rapporto tra i rispettivi *Biota to Sediment Accumulation Factor* (BSAF). Questo rapporto decresceva come segue: Cd (11,7) > Cu (5,5) > Pb (3,6) > Cr (1,5) > Zn (1,0), Ni (1,0). Il confronto tra il bioaccumulo dei metalli pesanti nei gamberi tra il sito inquinato esaminato e un sito di riferimento, ha confermato che i metalli accumulati in maniera significativa nell'organo di detossificazione erano cadmio e rame. Il presente approccio metodologico permette di valutare il livello di tossicità da metalli pesanti (solo per sostanze tossiche con modelli dose/risposta monotoni) dei sedimenti, attraverso il rapporto tra il BSAF di un tessuto di detossificazione e il BSAF di un tessuto non detossificante. Perciò, questo *marker* del livello di stress è uno strumento utile nelle decisioni gestionali mirate alla salvaguardia dell'ambiente.

## BIOACCUMULATION DE MÉTAUX LOURDS CHEZ L'ÉCREVISSE ROUGE DE LOUISIANE

Les métaux lourds constituent la pollution la plus fréquente dans les sédiments fluviaux. Ces sédiments qui sont un habitat pour les communautés benthiques sont également des réservoirs où s'accumulent les contaminants. Dans cette étude qui s'est déroulée sur une aire industrielle d'Italie centrale, nous avons analysé la bioaccumulation de métaux lourds (Cd, Cu, Pb, Cr, Zn et Ni) dans les tissus de *Procambarus clarkii*, une écrevisse utilisée comme bioindicateur de pollution métallique dans les écosystèmes d'eau douce. Les tissus de l'hépatopancréas (organe de détoxification) des écrevisses de Louisiane ont montré les plus fortes concentrations de métaux par rapport aux tissus de la musculature abdominale (tissus non détoxifiants). Cette relation entre deux types de tissus se retrouve dans le rapport biota: accumulation par le sédiment (BSAF, Biota to Sediment Accumulation Factor). Ce rapport décroît comme suit : Cd (11,7) > Cu (5,5) > Pb (3,6) > Cr (1,5) > Zn (1,0), Ni (1,0). La comparaison des valeurs d'accumulation de métaux lourds entre écrevisse et sites (pollué vs référence) confirme quel es métaux qui s'accumulent de façon significative dans l'hépatopancréas sont le cadmium et le cuivre. Notre approche méthodologique permet une évaluation du niveau de toxicité des métaux lourds du sédiment, au travers du rapport BSAF des tissus détoxifiants et non-détoxifiants. Ce marqueur du niveau de stress est ainsi un instrument utile à la décision pour les gestionnaires de l'environnement.



### 3.1 INTRODUZIONE

Le attività legate al territorio impattano in maniera rilevante sull'ambiente, comportando, *in primis*, il degrado degli habitat e un elevato rischio per gli organismi che li abitano, ivi compresa la popolazione umana. La produzione industriale e l'agricoltura, in combinazione con la crescita della popolazione e la conseguente urbanizzazione, sono le principali cause dell'inquinamento degli ecosistemi acquatici (EEA, 1999; Gomez-Gutierrez et al., 2007; Li et al., 2010).

I fiumi fungono da diffusori dell'inquinamento e i sedimenti, in particolare, svolgono un ruolo importante nell'accumulo e nel trasporto dei contaminanti attraverso i sistemi fluviali (Gomez-Gutierrez et al. 2006; Davutluoglu et al., 2011). Inoltre, l'additività, il sinergismo e l'antagonismo dei diversi agenti tossici, i processi di degradazione e di trasformazione possono produrre nuovi composti e contribuire alla complessità della tossicità totale dell'ambiente (Marking, 1985; Giesy et al., 1988; Giesy e Hoke, 1989).

I metalli pesanti sono tra gli inquinanti più frequenti che si ritrovano nell'ambiente e la rilevazione di alti livelli di queste sostanze negli ecosistemi d'acqua dolce indica, solitamente, la presenza di fonti antropiche, come ad esempio effluenti industriali, miniere, impianti di raffinazione, dilavamento di terreni agricoli, scarichi domestici e deposizioni atmosferiche (Abbas et al., 2008; Klavinš et al., 2000; Yu et al., 2001a).

Il carico di metalli di un sistema fluviale è anche influenzato e regolato da una varietà di fattori come la geologia del bacino, la geomorfologia, la reattività chimica, la litologia, l'idrologia, la vegetazione e la produttività biologica (Garrels et al., 1975; Warren, 1981; Aurada, 1983; Jain e Sharma, 2006).

I sedimenti dei corsi d'acqua possono fungere da serbatoi di metalli, e i metalli associati al sedimento possono essere rilasciati e accumulati negli organismi biologici, entrando così nella catena alimentare (Gibbs, 1977; Jain e Sharma, 2001; Filgueiras et al., 2002; Davutluoglu et al., 2011).

Pertanto, nei sedimenti, i metalli pesanti possono presentare diversa mobilità, interazioni e biodisponibilità (Arnason e Fletcher, 2003; Singh et al., 2005; Liu et al., 2009). In particolare, la misura della disponibilità biologica dipende dal taxon indagato, dall'*endpoint* utilizzato e da alcune variabili ambientali nel sedimento/acqua (Admiraal et al., 2000; Mäenpää et al., 2003; Desrosiers et al., 2008).



Un approccio basato esclusivamente sui parametri chimici e chimico-fisici non può essere sufficiente per valutare l'effetto totale dell'inquinamento (ad esempio da metalli pesanti) di un ecosistema sul suo biota (Rosemberg e Resh, 1993). In particolare, le sostanze inquinanti a basse concentrazioni sono più difficili da rilevare, soprattutto quando dipendono da carichi variabili stagionalmente, perché possono rimanere elusive (Archaimbault et al., 2010; Liess e Beketov, 2011). Pertanto, particolari taxa che vivono in stretto contatto con i sedimenti possono essere utilizzati come bioindicatori di inquinanti, come i metalli pesanti, che sono soggetti a bioaccumulo (Johnson et al., 1992).

Inoltre, i metalli pesanti come rame, zinco, cromo e nichel rientrano tra gli elementi essenziali, perché necessari nei cicli fisiologici e biochimici degli organismi viventi, incluso l'uomo; tuttavia, se assorbiti in quantità elevate, diventano tossici. Cadmio e piombo sono probabilmente elementi non essenziali per le attività metaboliche e risultano essere elementi tossici per gli organismi anche a basse concentrazioni. In sintesi, la tossicità di questi metalli, come quella di tutti gli elementi, interviene quando un organismo è esposto a quantità che superano i meccanismi omeostatici (Nielsen, 2000).

A questo scopo è stato preso in considerazione come bioindicatore il gambero rosso della Louisiana (*Procambarus clarkii* Girard, 1852). Il gambero rosso della Louisiana è una specie acquatica tollerante (Dörr et al., 2006), che tende ad accumulare i metalli nei propri tessuti, riflettendo così la loro abbondanza nell'ambiente circostante, fungendo da specie sentinella per il monitoraggio della salute ambientale (Pastor et al., 1988; Rincón-León et al., 1988; Madigosky et al., 1991; Devi et al., 1996; Bollinger et al., 1997; Alcorlo et al., 2006).

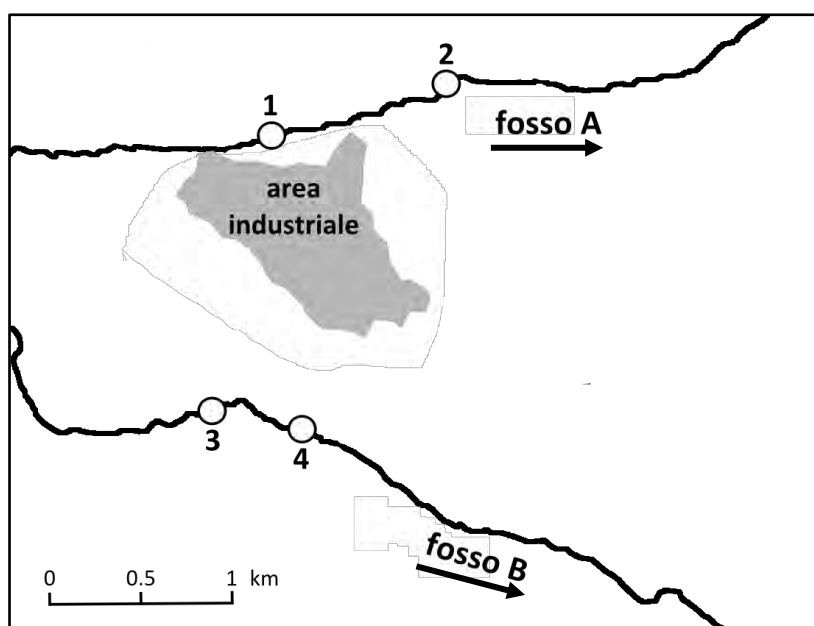
Scopo del presente lavoro è la predisposizione di un approccio metodologico per la valutazione del livello di tossicità da metalli pesanti che contaminano un sito (nel caso di studio, un'area industriale dell'Italia Centrale) attraverso l'analisi del bioaccumulo di una specie bioindicatrice modello (*Procambarus clarkii*).

### 3.2 MATERIALI E METODI

#### *Area di studio*

Questo studio si è concentrato su un sito industriale dell'Italia Centrale, in cui sono presenti diversi insediamenti produttivi, con un livello di inquinamento da metalli pesanti potenzialmente elevato a causa dell'avanzamento industriale e tecnologico. Per evitare eventuali problemi che prescindono dall'interesse scientifico, è omessa la precisa localizzazione geografica del sito industriale preso in esame.

L'area produttiva indagata è drenata principalmente da due fossi, a nord dal fosso A e a sud dal fosso B, in cui sono state identificate 4 stazioni di campionamento. Il regime idrologico di entrambi i fossi è dipendente esclusivamente dalle precipitazioni. Le stazioni (St. 1 e St. 2) del fosso A e quelle (St. 3 e St. 4) del fosso B sono delimitano gran parte dell'area industriale e sono collocate approssimativamente a circa 1 - 1,5 km dal centro dell'area industriale (Fig. 3.1).



**Figura 3.1** - Cartina dell'area di studio e localizzazione delle stazioni di campionamento (1 - 4).

#### *Specie bioindicatrice: *Procambarus clarkii* (Girard, 1852)*

*Procambarus clarkii* è stato introdotto per l'acquacoltura dagli Stati Uniti meridionali in Europa, inizialmente in Spagna negli anni '70 (Hasburgo-Lorena, 1986) e in Italia negli anni '90 (Gherardi et al., 1999).

Il gambero rosso della Louisiana è considerato il gambero di fiume più diffuso al mondo, in quanto sono molte le popolazioni acclimatatesi in quasi tutti i continenti, ad eccezione di Australia e

Antartide, ed è una delle specie di crostacei più utilizzate a scopo commerciale del mondo (Hobbs et al., 1989; Huner, 1994).

Questa specie alloctona è particolarmente invasiva, grazie all'elevata plasticità del suo ciclo biologico; è in grado di adattarsi alle diverse condizioni ambientali, vive in un ampio *range* di temperatura (dall'ibernazione all'estivazione), ha un'alta fecondità (centinaia di uova) e una dieta generalista basata su piante e animali (Gutiérrez-Yurrita e Montes, 1999; Paglianti e Gherardi, 2004).

Il gambero rosso della Louisiana è una specie estremamente tollerante poiché sopporta infatti livelli estremamente bassi di ossigeno in acqua, che bilancia respirando quello atmosferico, e mostra una grande capacità di resistere a malattie e stress ambientali causati da diversi inquinanti (Huner e Barr, 1991; Lindqvist e Huner, 1999).

La specie tende ad accumulare nel corpo i contaminanti, come i metalli pesanti, in particolare a livello dell'epatopancreas (ghiandola digestiva), delle branchie e dell'esoscheletro. In particolare, l'epatopancreas è un organo molto attivo metabolicamente, accumulando facilmente i contaminanti e partecipando al processo di detossificazione degli stessi. La muscolatura addominale, invece, accumula i contaminanti in maniera indiretta, per azione dell'emolinfa distribuita dal sistema circolatorio (Anderson et al., 1997; Alcorlo et al., 2006; Suárez-Serrano et al., 2010).

Tuttavia la muscolatura addominale costituisce la parte di maggior pregio alimentare e nei crostacei destinati all'alimentazione, Cd, Hg e Pb non devono superare  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$  di peso fresco (Regolamento CE n. 1881/2006).

#### *Campagna di campionamento*

La campagna di campionamento è stata effettuata in 3 campionamenti stagionali per ogni stazione (St. 1 - 4) da Giugno a Novembre 2012. Inoltre, ad Aprile 2013, è stato effettuato un'ulteriore campionamento solamente per le stazioni 1 e 2.

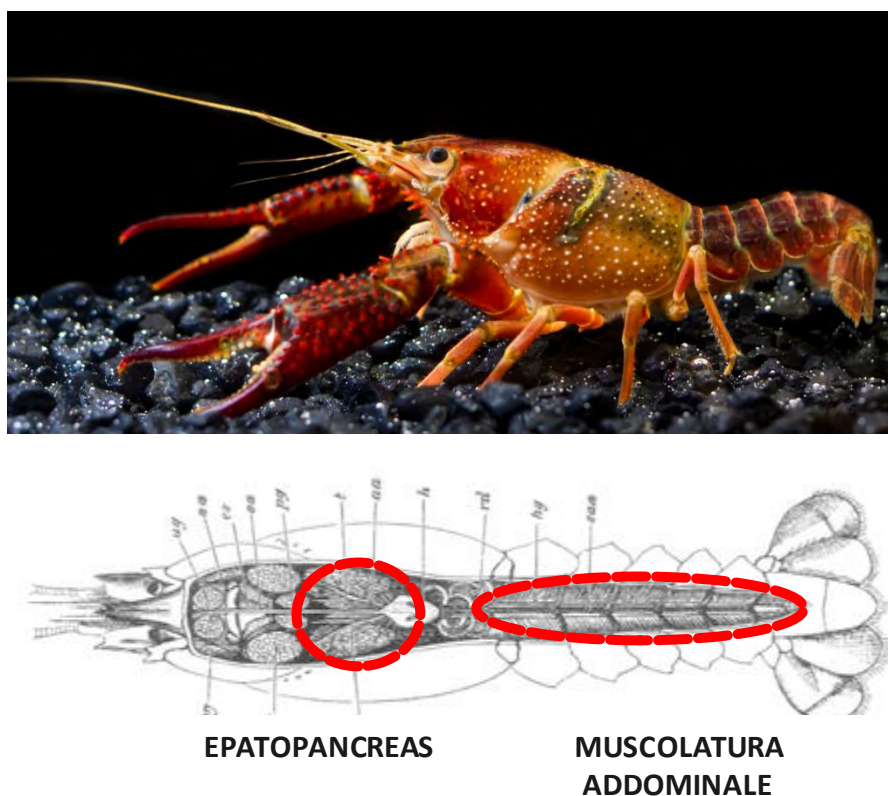
Sono stati raccolti campioni di sedimento per la determinazione dei metalli pesanti.

Per indagare i livelli di bioconcentrazione dei metalli pesanti, sono stati raccolti, con una rete di campionamento, 10 esemplari (4 maschi e 6 femmine) di *Procambarus clarkii*. I gamberi sono stati rinvenuti solamente alla St. 2, a Giugno e Luglio 2012. I gamberi rossi della Louisiana erano assenti alle St. 1, 3 e 4, quasi sempre in secca durante l'indagine e, a causa di lavori di scavo nel letto

fluviale del fosso A, sono risultati assenti anche durante i campionamenti di Novembre 2012 e Aprile 2013 alla St. 2.

Come esemplari di riferimento, sono stati presi in considerazione 10 esemplari (5 maschi e 5 femmine) di *P. clarkii* del Lago Trasimeno (Italia Centrale), in cui il gambero è stato segnalato per la prima volta nel 1999 (Dörr et al., 2001). Recentemente, la popolazione del gambero rosso della Louisiana del Lago Trasimeno è rapidamente aumentata e per questo è divenuta oggetto di pesca professionale (Dörr et al., 2006). Il Lago Trasimeno è il più esteso lago piatto dell'Italia (superficie: 124 km<sup>2</sup>, volume: 0,586 km<sup>3</sup>, profondità massima: 6,3 m).

I gamberi rossi della Louisiana sono stati lavati accuratamente con acqua distillata e congelati a -18 °C. Successivamente i gamberi sono stati dissezionati, dopo scongelamento, per prelevare l'epatopancreas e la muscolatura addominale (Fig. 3.2).



**Figura 3.2** - Esemplare di *Procambarus clarkii* e anatomia interna con localizzazione di epatopancreas e muscolatura addominale.

#### *Determinazione dei metalli pesanti nei sedimenti e nei tessuti biologici*

La concentrazione dei metalli pesanti (Cr, Cd, Cu, Ni, Zn, Pb) sono state determinate mediante Spettroscopia di Emissione Ottica con Plasma Accoppiato Induttivamente (ICP-OES Ultima2, HORIBA Scientific, limite strumentale di rilevazione: 0,14 - 1,58 µg L<sup>-1</sup>) equipaggiato con un

nebulizzatore a ultrasuoni (CETAC Technologies, U-5000AT). Sono state utilizzate soluzioni standard (ICP multi-element standard solution IV CertiPUR®, VWR Merck Chemicals and Reagents, 1000 mg L<sup>-1</sup>) in acido nitrico per preparare appropriati standard di calibrazione. Il limite di rilevabilità del metodo è risultato essere compreso tra 0,058 e 0,66 mg/kg.

Tutte le misurazioni dei metalli pesanti nei sedimenti e nei tessuti biologici sono basate su due repliche.

I campioni di sedimento sono stati ottenuti dragando lo strato superficiale (ca. 5 cm) dei sedimenti del fondale con una draga manuale. I campioni (500 g) sono stati conservati in bottiglie di polietilene e congelati a -18 °C (MATT and APAT 2005).

Tutti i campioni di sedimento sono stati essiccati all'aria, frantumati usando mortaio e pestello e fatti passare attraverso un setaccio con maglie di 2 mm, essiccati a 105 °C per 24h e digeriti come segue: sono stati aggiunti al campione (2,0 g) 15 mL di acido nitrico ultrapuro concentrato (Fluka, TraceSELECT®, per l'analisi di tracce ≥ 69%) e la miscela è stata riscaldata a 160 °C per 1h; successivamente, il recipiente è stato raffreddato a temperatura ambiente e sono stati aggiunti 10 mL di acido cloridrico ultrapuro concentrato (Fluka, TraceSELECT®, per l'analisi di tracce ≥ 37%) e il recipiente è stato riscaldato a 160 °C per 1h. La miscela è stata raffreddata, filtrata (filtri Whatman Grade No. 42, porosità 2,5 µm) e diluita con acqua ultrapura a 50 mL.

I gamberi rossi sono stati dissezionati per il prelievo dell'epatopancreas e della muscolatura addominale. Tali tessuti sono stati posti in stufa a 105 °C per l'essiccazione. Sono stati annotati il peso umido e il peso secco dei campioni, quindi si è effettuata la digestione mediante mineralizzazione acida convenzionale con 5 mL di acqua regia (HCl al 37%, e HNO<sub>3</sub> al 69% , in rapporto 3:1) ogni 0,5 g di tessuto riscaldando a 160 °C fino a quasi secchezza (Olowu et al., 2010). Dopo raffreddamento i digeriti sono stati filtrati (filtri Whatman Grade No. 42, porosità 2,5 µm) e portati a volume in matracci da 25 mL con acqua ultrapura (18.2 MΩ a 25 °C).

#### *Analisi statistiche*

Le variabili di metalli pesanti (nell'epatopancreas e nella muscolatura addominale) sono state comparate tra gli esemplari di gambero rosso raccolti nell'area di studio e quelli provenienti dal Lago Trasimeno (sito di riferimento) utilizzando i test di Mann-Whitney. Questi test statistici sono stati effettuati attraverso il software Past (versione 3.02) (Hammer et al., 2001).

### 3.3 RISULTATI

Nella Tabella 3.1 sono riportati i valori dei metalli pesanti esaminati (cadmio, piombo, zinco, cromo, nichel e rame) nei sedimenti delle St. 1 - 4. Le concentrazioni medie di Cd, Pb, Zn, Ni e Cu nei sedimenti erano più alte alla stazione 2, solo il Cr era più alto alle St. 1; mentre le medie più basse sono state registrate alla St. 3 per Cd, Zn, Ni e Cu, e alla St. 4 per Cr. Inoltre, l'analisi stagionale mostrava che tutti i metalli presentavano le massime concentrazioni medie a Luglio, tranne il Cu a Giugno, e quelle minime a Novembre (Cd, valore medio più alto 9,99 - valore medio più basso 4,43 mg L<sup>-1</sup>; Pb, 56,96 - 22,66 mg L<sup>-1</sup>; Zn, 158,37 - 97,10 mg L<sup>-1</sup>; Cr, 96,48 - 69,39 mg L<sup>-1</sup>; Ni 118,87 - 72,93 mg L<sup>-1</sup>; Cu, 92,67 - 42,62 mg L<sup>-1</sup>).

**Tabella 3.1** - Metalli pesanti nei sedimenti (cadmio, piombo, zinco, cromo, nichel e rame) del fosso A (St. 1 - 2) e del fosso B (St. 3 - 4), medie per stazione e medie stagionali; "---", non campionato. TEC (*Threshold Effect Concentration*), PEC (*Probable Effect Concentration*) da MacDonald et al., 2000.

St	Data	Cd (mg kg <sup>-1</sup> )	Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	Cr (mg kg <sup>-1</sup> )	Ni (mg kg <sup>-1</sup> )	Cu (mg kg <sup>-1</sup> )
1	Giu. 2012	11,57	43,44	176,82	84,63	114,24	74,08
1	Lug. 2012	6,46	49,95	225,84	135,82	124,80	93,21
1	Nov. 2012	3,31	13,60	68,15	62,11	63,34	17,69
1	Apr. 2013	4,62	15,58	81,65	83,41	88,23	17,10
	Media	6,49	30,64	138,12	91,49	97,65	50,52
2	Giu. 2012	16,29	61,67	189,83	79,83	106,72	115,47
2	Lug. 2012	16,45	85,69	212,13	97,44	173,79	105,70
2	Nov. 2012	7,38	42,04	148,63	81,45	100,73	72,30
2	Apr. 2013	9,79	50,37	186,87	74,51	100,74	124,22
	Media	12,48	59,94	184,36	83,30	120,50	104,42
3	Giu. 2012	1,96	29,47	77,92	63,93	76,27	32,50
3	Lug. 2012	9,57	50,91	84,19	100,99	94,75	47,07
3	Nov. 2012	2,15	14,42	73,93	55,29	52,71	32,08
3	Apr. 2013	---	---	---	---	---	---
	Media	4,56	31,60	78,68	73,40	74,58	37,22
4	Giu. 2012	4,20	29,95	137,84	61,32	67,85	148,64
4	Lug. 2012	7,49	41,29	111,30	51,69	82,15	55,01
4	Nov. 2012	4,89	20,57	97,69	78,71	74,94	48,40
4	Apr. 2013	---	---	---	---	---	---
	Media	5,53	30,60	115,61	63,91	74,98	84,02
Media e d i a	Giu. 2012	8,50	41,13	145,60	72,43	91,27	92,67
	Lug. 2012	9,99	56,96	158,37	96,48	118,87	75,25
	Nov. 2012	4,43	22,66	97,10	69,39	72,93	42,62
	Apr. 2013	7,20	32,97	134,26	78,96	94,48	70,66
	TEC	0,99	35,80	121,00	43,40	22,70	31,60
	PEC	4,98	128,00	459,00	111,00	48,60	149,00

La legislazione italiana non fissa limiti soglia di concentrazione di contaminanti per i sedimenti dei corsi d'acqua. Tuttavia, per una previsione sulla tossicità dei metalli nei sedimenti, si può fare riferimento ai limiti di concentrazione in accordo con le linee guida della qualità dei sedimenti (*Sediment Quality Guidelines*) elaborate da MacDonald et al. (2000). Questi valori soglia, specifici per i singoli metalli pesanti esaminati, sono denominati TEC (*Threshold Effect Concentration*) e PEC (*Probable Effect Concentration*). Al disotto dei valori di TEC non si dovrebbero avere effetti negativi sugli organismi acquatici, mentre valori maggiori di PEC producono probabilmente effetti dannosi. Le concentrazioni di Cd eccedevano sempre il valore TEC ed eccedevano il valore PEC alla St. 1, 3 e 4 solo a Luglio 2012, alla St. 1 a Giugno 2012, mentre alla St. 2, la concentrazione del Cd era sempre più alto del valore di riferimento PEC. Il Ni era sempre maggiore del valore PEC in tutte le stazioni, durante tutta l'indagine. Il Cr eccedeva il valore PEC solo a Luglio 2012 alla St.1, tutti gli altri valori eccedevano il valore TEC. Pb, Zn e Cu non erano mai più alti della soglia PEC, ma eccedevano sempre il valore TEC alla St. 2 e frequentemente alle altre stazioni.

In Tabella 3.2a sono riportati i valori dei metalli pesanti nei tessuti dell'epatopancreas e della muscolatura addominale di 20 esemplari di gambero campionati nel sito industriale (St. 2, 10 esemplari) e nel sito di riferimento (Lago Trasimeno, 10 esemplari). La lunghezza media del corpo era di 7,82 ( $\pm 1,82$ ) cm per i gamberi del sito industriale (St. 2) e di 8,16 ( $\pm 1,64$ ) cm per quelli del Lago Trasimeno. In entrambi i siti, gli esemplari di sesso femminile erano in media di maggiori dimensioni (circa del 10%) rispetto a quelli maschili.

Nel sito industriale, l'epatopancreas, quando comparato con la muscolatura addominale, mostrava concentrazioni medie più elevate di Cd (valori maggiori di 11,7 volte), Cu (5,5 volte), Pb (3,6 volte) e Cr (1,5 volte); con l'eccezione di Zn e Ni (entrambi 1 volta) (Tab. 3.2b). Una maggiore contaminazione dell'epatopancreas si rilevava anche nel sito di controllo (Lago Trasimeno) con concentrazioni medie più elevate di Pb (4,3 volte), Cd (3,7 volte), Ni (3,5 volte), Cr (2,3 volte) e Zn (1,7 volte); unica eccezione Cu (0,9 volte) (Tab. 3.2b).

Il rapporto tra le concentrazioni dei metalli negli epatopancreas dei gamberi prelevati dal sito industriale e quelle misurate negli epatopancreas dei gamberi del Lago Trasimeno, mostrava valori elevati solo per Cu (44 volte) e Cd (3,5 volte), mentre risultava inferiore all'unità per Zn, Cr, Pb e Ni (Tab. 3.2c). Il corrispondente rapporto tra le muscolature addominali mostrava concentrazioni medie più elevate per Cu (6,9 volte) Zn (1,6 volte), Cr (1,3 volte) e Cd (1,1 volte), mentre risultava inferiore all'unità per Ni e Pb (Tab. 3.2c).

**Tabella 3.2 - (a)** Sesso, lunghezza corpo, e concentrazioni dei metalli pesanti nell'epatopancreas e nella muscolatura addominale dei gamberi dell'area di studio (St. 2) e del Lago Trasimeno (calcolati su peso secco); **(b)** rapporto tra le concentrazioni dei metalli pesanti nell'epatopancreas e nella muscolatura addominale per l'area di studio e il sito di riferimento; **(c)** rapporto tra le concentrazioni dei metalli pesanti nell'area di studio e nel sito di riferimento per l'epatopancreas e la muscolatura addominale.

(a)

Area di studio (St. 2)	Sesso	L. corpo (cm)	Epatopancreas (mg kg <sup>-1</sup> )						Muscolatura addominale (mg kg <sup>-1</sup> )					
			Cd (mg kg <sup>-1</sup> )	Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	Cr (mg kg <sup>-1</sup> )	Ni (mg kg <sup>-1</sup> )	Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	Cd (mg kg <sup>-1</sup> )	Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	Cr (mg kg <sup>-1</sup> )	Ni (mg kg <sup>-1</sup> )	Cu (mg kg <sup>-1</sup> )
Giu. 2012	F	6,70	32,00	5,20	288,66	19,17	0,30	1310,55	0,13	0,66	262,55	8,26	0,30	185,95
Giu. 2012	F	9,50	5,13	0,66	95,87	7,29	0,30	617,13	0,13	0,66	107,36	14,59	1,08	163,38
Giu. 2012	M	6,80	23,15	3,93	156,55	1,02	8,51	661,57	5,37	2,79	260,14	0,26	6,28	106,41
Giu. 2012	M	7,00	38,30	0,49	123,40	0,90	3,05	708,37	3,08	0,50	89,39	0,35	1,64	218,82
Lug. 2012	F	10,00	10,64	0,78	61,65	0,68	3,81	667,84	1,09	0,09	96,20	1,36	5,14	96,70
Lug. 2012	F	10,20	38,34	0,66	56,39	2,34	0,30	1126,76	1,02	0,66	106,12	2,94	0,30	174,95
Lug. 2012	M	9,70	73,39	0,66	346,76	21,17	0,30	3596,50	0,13	0,66	105,04	4,07	0,30	146,72
Lug. 2012	F	7,00	10,30	2,77	88,85	0,10	3,40	481,58	3,26	1,45	167,66	0,67	3,69	327,31
Lug. 2012	M	5,80	32,07	10,95	135,74	0,95	2,02	873,52	4,36	0,67	133,78	0,10	5,60	153,65
Lug. 2012	F	5,50	19,02	5,60	171,11	0,87	11,01	261,39	5,59	0,66	227,81	4,05	9,68	297,10
Media		7,82	28,23	3,17	152,50	5,45	3,30	1030,52	2,41	0,88	155,60	3,67	3,40	187,10
Lago Trasimeno														
Sett. 2012	M	11,35	2,17	1,48	131,58	2,12	3,74	17,20	1,26	1,69	66,58	3,48	2,54	26,96
Sett. 2012	F	10,22	1,96	1,80	75,69	1,22	3,48	9,81	1,29	1,14	100,95	3,04	3,32	12,42
Sett. 2012	F	8,64	6,12	7,36	159,01	3,33	10,32	15,89	2,08	1,77	131,22	3,03	3,60	29,04
Sett. 2012	M	7,87	9,20	11,15	207,34	9,30	13,14	28,55	1,97	1,90	46,54	5,30	1,83	29,00
Sett. 2012	F	7,66	2,07	2,20	52,50	1,40	8,21	3,60	2,35	2,35	98,28	0,73	4,56	12,33
Sett. 2012	F	8,16	3,70	3,74	85,52	0,94	3,59	9,64	2,08	1,72	129,03	1,52	4,06	26,85
Sett. 2012	F	8,08	5,24	5,64	150,91	1,46	10,01	21,48	2,26	2,00	112,96	0,76	3,78	27,24
Sett. 2012	M	7,09	6,74	0,66	94,77	28,08	2,49	80,51	1,18	0,66	53,17	6,16	0,30	49,27
Sett. 2012	M	6,98	10,60	11,74	248,41	2,32	13,01	31,27	3,66	3,10	119,03	4,08	5,43	32,93
Sett. 2012	M	5,57	33,72	39,23	447,51	16,18	58,02	16,21	4,17	3,25	119,56	1,13	6,58	23,25
Media		8,16	8,15	8,50	165,32	6,64	12,60	23,42	2,23	1,96	97,73	2,93	3,60	26,93

(b)

Epatopancreas/Muscolatura						
	Cd	Pb	Zn	Cr	Ni	Cu
Area di studio (St. 2)	11,7	3,6	1,0	1,5	1,0	5,5
Lago Trasimeno	3,7	4,3	1,7	2,3	3,5	0,9

(c)

Area di studio(St.2)/Lago Trasimeno						
	Cd	Pb	Zn	Cr	Ni	Cu
Epatopancreas	3,5	0,4	0,9	0,8	0,3	44,0
Muscolatura	1,1	0,4	1,6	1,3	0,9	6,9

I test di Mann-Whitney (Tab. 3.4) hanno evidenziato le differenze significative tra le concentrazioni dei vari metalli pesanti nei differenti tessuti. Il Cd mostrava differenze significative (Mann-Whitney tests,  $P < 0.05$ ) tra le concentrazioni nell'epatopancreas e quelle misurate nella muscolatura addominale, sia per gli esemplari dell'area di studio che per gli esemplari del sito di controllo (Lago Trasimeno). Ciò non si riscontra per gli altri metalli pesanti, tranne che per il Cu, ma limitatamente agli esemplari del sito industriale. Inoltre, il Cd mostrava differenze significative tra i valori dei tessuti (epatopancreas e muscolatura addominale) del sito industriale con i rispettivi tessuti del sito di controllo, ad eccezione della muscolatura addominale. Per il Cu, questi confronti,



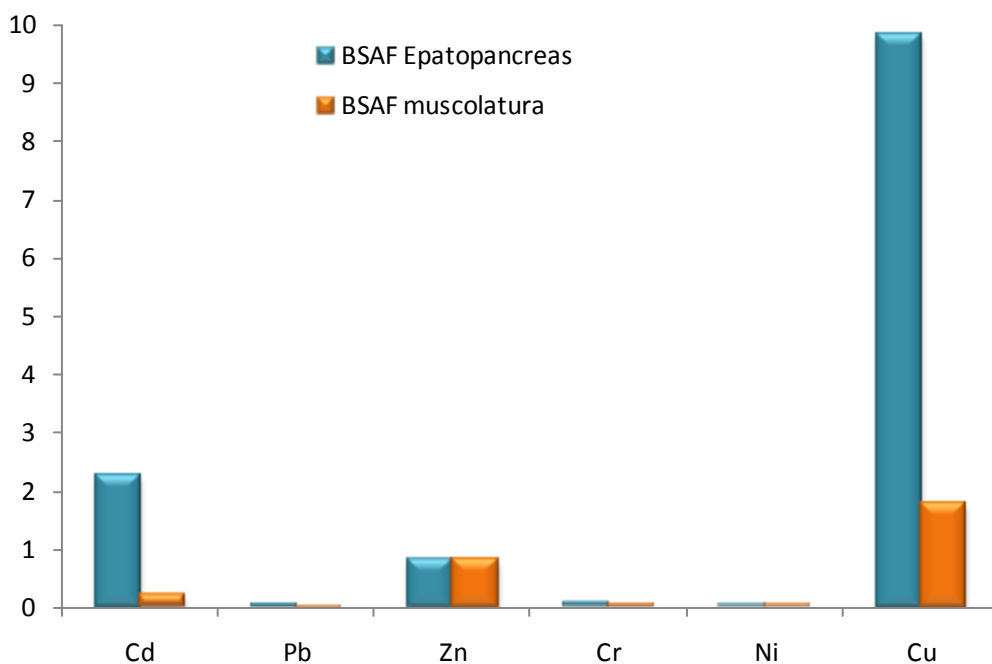
risultavano sempre significativi. Il Pb mostrava differenze significative tra la muscolatura addominale degli esemplari del sito industriale e la muscolatura addominale degli esemplari del sito di controllo, e tra la muscolatura addominale degli esemplari del sito industriale e l'epatopancreas degli esemplari del sito di controllo; il Ni mostrava differenze significative tra l'epatopancreas degli esemplari dell'area di studio e l'epatopancreas di quelli del sito di controllo, e tra la muscolatura addominale degli esemplari del sito industriale e l'epatopancreas di quelli del sito di controllo. In nessun caso, lo Zn e il Cr presentavano differenze significative tra le concentrazioni nei differenti tessuti.

**Tabella 3.4** - Differenze significative tra le concentrazioni dei vari metalli pesanti nei differenti tessuti; "\*", Mann-Whitney tests,  $P < 0,05$ .

	Area di studio (St. 2)		Lago Trasimeno	
	Epatopancreas	Muscolatura	Epatopancreas	Muscolatura
<b>Cd</b>				
Area di studio (St. 2)				
Epatopancreas	---			
Muscolatura	0,0003*	---		
Lago Trasimeno				
Epatopancreas	0,0058*	0,0255*	---	
Muscolatura	0,0002*	0,7910	0,0172*	---
<b>Pb</b>				
Area di studio (St. 2)				
Epatopancreas	---			
Muscolatura	0,1010	---		
Lago Trasimeno				
Epatopancreas	0,1111	0,0017*	---	
Muscolatura	1	0,0058*	0,0695	---
<b>Zn</b>				
Area di studio (St. 2)				
Epatopancreas	---			
Muscolatura	0,7337	---		
Lago Trasimeno				
Epatopancreas	0,9698	0,6232	---	
Muscolatura	0,1859	0,1212	0,1405	---
<b>Cr</b>				
Area di studio (St. 2)				
Epatopancreas	---			
Muscolatura	0,8205	---		
Lago Trasimeno				
Epatopancreas	0,2123	0,3447	---	
Muscolatura	0,5708	0,5205	0,7337	---
<b>Ni</b>				
Area di studio (St. 2)				
Epatopancreas	---			
Muscolatura	0,7869	---		
Lago Trasimeno				
Epatopancreas	0,0168*	0,0255*	---	
Muscolatura	0,3410	0,7044	0,0640	---
<b>Cu</b>				
Area di studio (St. 2)				
Epatopancreas	---			
Muscolatura	0,0003*	---		
Lago Trasimeno				
Epatopancreas	0,0002*	0,0002*	---	
Muscolatura	0,0002*	0,0002*	0,1859	---

Infine, nell'area di studio, St. 2, in cui sono stati rinvenuti i gamberi, i BSAF (Biota to Sediment Accumulation Factor: rapporto tra la concentrazione di un metallo nei tessuti e nei sedimenti) in *P. clarkii* erano > 1 solo per Cd (2,26) e Cu (9,87) in relazione all'accumulo nell'epatopancreas e per Cu (1,79) in relazione all'accumulo nella muscolatura addominale (Fig. 3.2). Il BSAF decresceva come segue: Cu > Cd > Zn > Cr > Pb > Ni per l'epatopancreas e Cu > Zn > Cd > Cr > Ni > Pb per la muscolatura addominale.

**Figura 3.2** - Confronto tra i BSAF dell'epatopancreas e della muscolatura addominale nell'area di studio (St. 2).



### 3.4 DISCUSSIONE

Il presente studio riporta indagini sul campo riguardanti alcuni metalli pesanti accumulati nei sedimenti dei corsi d'acqua drenanti un'area con attività industriali, e il trasferimento di questi metalli nella catene trofiche degli ecosistemi d'acqua dolce (Hsu et al., 2006; Zhou et al., 2008).

In effetti, i sedimenti costituiscono un habitat per la comunità bentonica, ma anche una riserva per i contaminanti comuni, come i pesticidi, gli idrocarburi policiclici aromatici, i policlorobifenili e i metalli pesanti. Questi contaminanti possono avere una persistenza di lunga durata e interagire in diverse combinazioni con altri elementi introdotti successivamente, generando fenomeni di additività, sinergismo e antagonismo (Calamari e Alabaster, 1980; Marking, 1985; Calabrese, 1991). Inoltre, il bioaccumulo e il trasferimento trofico sono rilevabili anche nella fauna dei sistemi terrestri (come ad esempio nel caso di specie di uccelli, Maul et al., 2006).

Le concentrazioni dei metalli pesanti rilevate nei sedimenti delle quattro stazioni di campionamento dell'area industriale investigata indicavano una grande concentrazione di metalli, in particolare di cadmio (elemento non essenziale), nel mese di luglio e alla St. 2. Proprio in questa stazione più alterata del sito industriale, e nei mesi con maggiore inquinamento da metalli (Giugno e Luglio), sono stati rinvenuti gli esemplari del gambero *Procambarus clarkii*, utile bioindicatore dell'inquinamento da metalli pesanti nei sistemi d'acqua dolce (Naqvi e Howell, 1993; Devesa et al., 2002; Sánchez-López et al., 2003; Suárez-Serrano et al. 2010). Pertanto, l'analisi del livello di bioaccumulo dei metalli nei tessuti del gambero rifletteva il massimo livello di contaminazione all'interno del sito industriale.

L'entità dei metalli trasferiti riflette anche il ruolo metabolico specie-specifico di ognuno di essi in *Procambarus clarkii* (Khan et al., 1995; Schilderman et al., 1999; Sánchez-López et al., 2004).

Di norma, queste risposte seguono le classiche curve dose-risposta, anche se devono essere presi in considerazione, per alcune sostanze tossiche, dei modelli dose-risposta non monotoni (Connon et al., 2012).

Sono state rilevate risposte sia metallo-specifiche che tessuto-specifiche, in relazione al ruolo che ogni metallo esaminato manifesta nel metabolismo dei gamberi, nel sito industriale e nel sito di riferimento.

In accordo con la letteratura, l'epatopancreas mostrava più alte concentrazioni di metalli rispetto alla muscolatura addominale (Anderson et al., 1997; El-Shaikh et al., 2005). Tuttavia, la muscolatura addominale può presentare livelli di metalli pesanti che eccedono i valori stabiliti dalla legislazione dell'Unione Europea: i limiti sono 0,5 mg kg<sup>-1</sup> su peso fresco per Cd, Pb e Hg

(Regolamento CE n. 1881/2006). Nel presente studio i livelli di alcuni metalli pesanti nella muscolatura addominale erano simili a quelli riscontrati in diverse aree interessate da inquinamento da metalli pesanti (Suárez-Serrano et al. 2010).

Inoltre, i BSAF a livello dell'epatopancreas mostravano nell'area di studio un bioaccumulo elevato solo per Cd e Cu, rispettivamente di circa 10 e 2,3 volte, mentre, i BSAF della muscolatura addominale mostravano un valore elevato solo per Cu, di circa 1,8 volte. In effetti, in letteratura si rileva spesso che Cd e Cu presentino i più alti valori di BSAF nell'epatopancreas (Alcorlo et al., 2006).

Nel sito investigato, il rapporto tra il bioaccumulo dei metalli nell'epatopancreas rispetto a quello nella muscolatura addominale era particolarmente elevato per Cd, considerevole per Cu e Pb e lieve per Cr. Ni e Zn presentavano invece livelli simili in entrambi i tessuti. Questi risultati sono in accordo con El-Shaikh et al. (2005), Alcorlo et al. (2006) e Martín-Díaz (2006). Questo rapporto decresceva come segue:  $Cd > Cu > Pb > Cr > Zn$ , Ni e può essere anche espresso dal rapporto tra il BSAF dell'epatopancreas) e il BSAF della muscolatura addominale), per i vari metalli.

L'epatopancreas è coinvolto in una varietà di processi fisiologici e svolge un ruolo importante nella detossificazione e nel sequestro dei metalli pesanti (Roldan e Shivers, 1987; Viarengo, 1989; Icely and Nott, 1992; Alcorlo et al., 2006). Per questo motivo, i metalli più tossici, come cadmio, elemento non essenziale metabolicamente (Hsu et al., 2006), mostrano una maggiore concentrazione nei tessuti dell'epatopancreas dei gamberi esposti ad ambienti inquinati (Rubio et al., 1991; Rainbow, 1997). Pertanto, un'indicazione sulla tossicità dei metalli pesanti contaminanti un sito, è data dall'entità del rapporto tra i valori rilevati nei tessuti con alta e bassa attività detossificante del bioindicatore utilizzato, nel nostro caso, rispettivamente, epatopancreas e muscolatura addominale di *P. clarkii*. Interessante sarebbe definire dei valori di riferimento di questo *marker* per la valutazione della contaminazione.

I gamberi rossi della Louisiana provenienti dal sito di controllo (Lago Trasimeno), soggetti a pesca per scopo alimentare, mostravano sempre un maggiore bioaccumulo da metalli pesanti nell'epatopancreas rispetto alla muscolatura addominale (la parte di maggior pregio alimentare), con l'eccezione del Cu. Questi tessuti mostravano un rapporto che decresceva come segue:  $Pb > Cd > Ni > Cr > Zn > Cu$ . La contaminazione da piombo (elemento non essenziale metabolicamente) dei gamberi del Lago Trasimeno probabilmente risente di decenni di viabilità stradale verso questa località turistica, poiché nel passato le automobili utilizzavano carburanti contenenti piombo (Hernberg, 2000).

Inoltre, una verifica sul livello di bioaccumulo da metalli pesanti nel bioindicatore usato è data dal rapporto tra i valori rilevati nei tessuti provenienti dal sito indagato e quelli corrispondenti provenienti da un sito di controllo. Nel presente caso, il rapporto tra le concentrazioni dei metalli pesanti per l'epatopancreas decresceva come segue:  $Cu > Cd > Zn > Cr > Pb > Ni$ , e per la muscolatura addominale come segue:  $Cu > Zn > Cr > Cd > Ni > Pb$ .

Prendendo in considerazione la risposta biologica di *P. clarkii* a livello dell'epatopancreas, organo elettivo per la detossificazione unitamente alle ghiandole antennali dei crostacei decapodi (Vogt, 2002), è emerso che, nel sito industriale, i metalli significativamente accumulati, e pertanto più tossici, risultano cadmio e rame.

### 3.5 CONCLUSIONI

Il presente approccio metodologico consente di valutare il livello di tossicità dei metalli pesanti (solo per sostanze tossiche con modelli dose/risposta monotoni) nei sedimenti di corsi d'acqua che drenano un'area contaminata, tramite i seguenti step:

1. analisi dei metalli pesanti nei sedimenti;
2. scelta di un bioindicatore appropriato (anche svolgendo esperimenti di traslocazione);
3. valutazione dei BSAF dei metalli pesanti sia in tessuti di detossificazione che in tessuti non detossificanti;
4. valutazione delle sostanze tossiche attraverso il rapporto tra il BSAF di tessuti di detossificazione e il BSAF di tessuti non detossificanti: questo rapporto è un *marker* del livello di stress;
5. verifica mediante il confronto del bioaccumulo dei metalli pesanti nell'organo di detossificazione tra bioindicatori viventi in un sito inquinato e in un sito di riferimento (non o poco inquinato).

In sintesi, questo *marker* permette di valutare la tossicità totale dei sedimenti riguardo ai metalli pesanti (approccio *top-down*, infatti l'interazione tra questi metalli e le altre sostanze chimiche nei sedimenti non è analizzata) misurando il livello di stress dell'organo di detossificazione del bioindicatore. Di conseguenza, tale *marker* può essere utilizzato con successo quale strumento utile nelle decisioni gestionali mirate alla salvaguardia dell'ambiente.



# **PARTE 2**

**METALLI PESANTI E COMUNITÀ DI MACROINVERTEBRATI**





# 4

## IMPATTO DEI METALLI PESANTI SULLE COMUNITÀ ATTRAVERSO L'ANALISI BASATA SUI TRATTI BIO-ECOLOGICI

Sono state studiate le relazioni tra le comunità di macroinvertebrati e le caratteristiche ambientali nel bacino del Fiume Nestore (Italia Centrale). L'analisi dei tratti funzionali dei macroinvertebrati ha evidenziato che questo approccio costituisce un potente strumento per valutare il grado di alterazione indotta dall'attività umana. Sono state selezionate dieci stazioni di campionamento; ad ogni stazione, sono state considerate e caratterizzate attraverso l'Analisi delle Componenti Principali, 24 variabili ambientali. Sono stati raccolti un totale di 37249 esemplari di macroinvertebrati appartenenti a 91 taxa. L'analisi simultanea della matrice delle abbondanze dei macroinvertebrati trasformata logaritmicamente e l'applicazione dell'Analisi della Corrispondenza Sfocata alla matrice dei tratti delle specie è stata effettuata attraverso l'Analisi di Co-inerzia. Le stazioni più inquinate hanno presentato un più ampio *range* di variazione stagionale per quanto riguarda l'analisi ambientale rispetto all'analisi biologica; un risultato inverso è emerso quando sono state prese in considerazione le stazioni che mostravano una migliore qualità ambientale. Tuttavia, quando le stazioni sono state analizzate sulla base sia delle variabili ambientali che sulla base dei dati biologici, è emerso un *trend* simile nei livelli di inquinamento, sebbene l'analisi biologica fosse più efficace nel separare l'alterazione dovuta agli inquinanti a basse concentrazioni. I tratti funzionali dei macroinvertebrati giocano quindi un ruolo centrale nella biovalutazione dei sistemi fluviali stressati e possono essere utilizzati per la definizione del livello di disturbo antropico, in condizioni di inquinamento che vanno da lieve a moderato.

## IMPACT DES MÉTAUX LOURDS SUR LES COMMUNAUTÉS - ANALYSE BASÉE SUR LES TRAITS BIO-ÉCOLOGIQUES

Nous avons étudié les relations entre la composition taxonomique et en traits bio-écologiques des communautés d'invertébrés d'une part, et les caractéristiques environnementales des cours d'eau du bassin versant du Nestore (Italie centrale) d'autre part. Les traits bio-écologiques décrivent la niche occupée par un organisme, à la fois en terme d'effet de l'environnement sur l'individu (traits 'réponses'), et d'impact de l'individu sur son environnement (traits 'effets'). Par conséquent, ces traits ont un fort potentiel indicateur pour évaluer le niveau d'altération anthropique des écosystèmes. Nous avons sélectionné 10 stations le long du Nestore où nous avons échantillonné, aux 4 saisons d'un cycle annuel, les communautés benthiques ainsi que 24 variables environnementales. Pour l'ensemble des 91 taxa récoltés (37249 individus) nous avons décrit 22 traits bio-écologiques. L'analyse simultanée des matrices stations x abondances et taxa x traits, via une analyse de co-inertie, a permis de mettre en évidence des combinaisons de traits par groupes de stations aux différentes saisons. Les stations les plus polluées présentaient de larges variations saisonnières en terme de physico-chimie, tandis que les traits bio-écologiques restaient stables sur ces sites. Ces résultats s'expliquent d'une part par les variations hydrologiques qui créent une dilution des polluants en période de hautes eaux, et par la très faible diversité taxonomique des sites les plus impactés qui réduit la diversité et la variabilité des traits de vie associés à quelques taxa polluo-résistants (ex. oligochètes, chironomides). A l'inverse, les

sites non pollués présentaient une stabilité physico-chimique mais une variabilité saisonnière en terme de traits. Ce résultat s'explique par la plus forte diversité biologique, notamment des insectes aquatiques polluosensibles dont la saisonnalité influence la composition en traits de la communauté. Enfin, les traits bio-écologiques se sont révélés plus efficaces pour détecter un impact écologique des faibles niveaux de pollution. Les traits bio-écologiques sont susceptibles de jouer un rôle clé dans la bioindication des écosystèmes d'eau douce, pour déterminer les niveaux d'altération écologique dès les plus faibles niveaux de perturbation.

## 4.1 INTRODUZIONE

I macroinvertebrati dei corsi d'acqua sono altamente integrati nella struttura e nel funzionamento degli habitat bentonici (Southwood, 1977; Minshall, 1988), in cui costituiscono un'importante componente della produzione secondaria (Oertli, 1993). Quindi, in condizioni naturali, i cambiamenti funzionali nelle comunità di macroinvertebrati lungo un gradiente monte-valle vanno in parallelo con il gradiente continuo delle caratteristiche fisiche dei corsi d'acqua da monte a valle (Merritt e Cummins, 1978; Vannote et al., 1980; Cummins e Wilzbach, 1985). I macroinvertebrati vivono tipicamente in stretto contatto con il substrato dei corsi d'acqua, in cui i sedimenti possono formare un deposito per i contaminanti biologici e chimici (Warren, 1981; Yu et al., 2001a; Li et al., 2010); sono quindi largamente utilizzati come indicatori biologici dell'impatto antropogenico sugli ecosistemi d'acqua dolce (Armitage et al., 1983; Bonada et al., 2006; Dolédec e Statzner, 2008).

È noto che alcuni taxa bentonici accumulano sostanze tossiche (ad esempio metalli pesanti, pesticidi, IPA, PCB, etc.) e rispondono agli stress ambientali su una scala di unità tassonomica, o attraverso il processo di biomagnificazione (Luoma, 1983; Naimo, 1995; Bervoets et al., 1997; Santoro et al., 2009), o ancora attraverso lo sviluppo di malformazioni morfologiche (vedi apparati boccali delle larve di chironomidi-Diptera) (Vermeulen, 1995; Di Veroli et al., 2012b, 2014), anche quando gli effetti dei contaminanti chimici a basse concentrazioni negli ecosistemi d'acqua dolce rimangono elusivi (Liess e Beketov, 2011).

È interessante notare che i macroinvertebrati rivelano in modo efficace anche la qualità biologica delle acque dolci a livello di comunità o raggruppamento (composizione, schemi quantitativi). In effetti, le specie sensibili all'inquinamento tendono a diminuire in termini di abbondanza o a scomparire, in condizioni disturbate, a seconda del tipo e del grado di alterazione (Usseglio-Polatera e Beisel, 2002; Céréghino et al., 2003; Archaimbault et al., 2010).

Nell'implementazione delle recenti politiche sulle acque in Europa e in altri paesi, sono stati progettati diversi indici biologici che quantificano la diversità delle comunità di macroinvertebrati per valutare la salute ecologica degli ecosistemi (Barbour et al., 1999; Niemi e McDonald, 2004; Hering et al., 2006; Baptista et al., 2007), cioè per misurare il grado di alterazione rispetto ad una condizione di riferimento, inalterata (Birk et al., 2012; Mondy et al., 2012). Negli ultimi due decenni, si è andato sempre più sviluppando un approccio di analisi dei popolamenti macrobentonici basato sui "tratti bio-ecologici" funzionali (Usseglio-Polatera et al., 2000a, 2000b, 2001; Archaimbault et al., 2010; Fabrizi et al., 2010; Statzner e Bêche, 2010). Nello specifico, la

codifica sfocata dei tratti delle specie (Chevenet et al., 1994) ha permesso la valutazione integrata delle relazioni tra le strategie ecologiche e le condizioni ambientali, indipendentemente dalle specie identificate (Tachet et al., 2010).

Nella valutazione delle condizioni ambientali di un corso d'acqua, l'aggregazione dei taxa in categorie (tratti) basati sul ciclo vitale, sul comportamento, sulla fisiologia, sui requisiti di habitat e sulla sensibilità all'inquinamento potrebbe dare maggiori informazioni dell'aggregazione sulla base della posizione tassonomica delle varie componenti (Richards et al., 1997; Statzner et al., 1997; Usseglio-Polatera et al., 2000a, 2002; Bonada et al., 2006).

A questo proposito, è stato dimostrato (Usseglio-Polatera et al., 2000b; Statzner et al., 2001, 2005; Gayraud et al., 2003) che l'analisi dei tratti dei macroinvertebrati è particolarmente rilevante per distinguere i differenti livelli di stress. Inoltre, la conoscenza del livello degli inquinanti non permette di prevedere la risposta funzionale delle comunità bentoniche e, in particolare, è ben noto che questi effetti non variano linearmente con la loro concentrazione (Archaimbault et al., 2010; Statzner e Bêche, 2010).

Il principale scopo si è posto come obiettivo la comparazione dell'ordinamento dei siti basata sui tratti (valutazione biologica) con l'ordinazione sulla base della chimica delle acque (valutazione chimica), per valutare la qualità di un ecosistema fluviale espressa dai tratti funzionali dei macroinvertebrati, in un contesto di livelli differenti di contaminazione chimica.

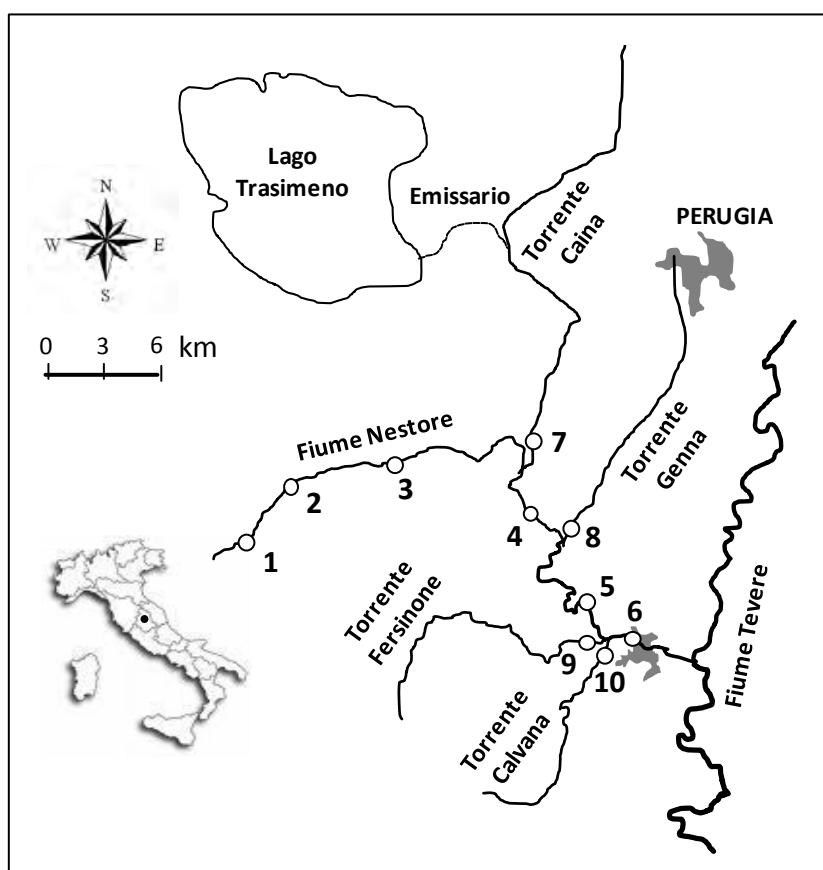
Per affrontare questi problemi, è stato preso in considerazione il bacino del Fiume Nestore (Italia Centrale). In quest'area gli insediamenti umani e le attività economiche hanno generato diverse e numerose sorgenti di inquinamento (acque di scarico di allevamenti zootecnici, acque di dilavamento dei terreni agricoli, scarichi civili ed industriali) che, nonostante i numerosi progetti di risanamento, causano un inquinamento costante e significativo dovuto principalmente ai nutrienti e ai metalli pesanti.

## 4.2 MATERIALI E METODI

### *Area di studio*

La litologia del bacino del Fiume Nestore (Umbria, Italia Centrale) è caratterizzata da una medio-bassa permeabilità. Nel passato (numerosi lavori idraulici dai tempi Romani fino all'ultimo secolo), il bacino si estendeva da 725 km<sup>2</sup> a 1116 km<sup>2</sup> per la presenza di un emissario che si dipartiva dal Lago Trasimeno; tuttavia, dal 1990, questi due sistemi idrografici sono rimasti indipendenti, poiché il basso livello del Lago Trasimeno non permetteva all'emissario di entrare nel bacino del lago (Mearelli et al., 1996).

Il Fiume Nestore ha una lunghezza totale di circa 48 km; esso riceve le acque dei suoi affluenti di sinistra, i torrenti Genna (23 km) e Caina (31 km), e dei suoi affluenti di destra, i torrenti Fersinone (25 km) e Calvana (18 km) (Fig. 4.1).



**Figura 4.1** - Cartina dell'area di studio e localizzazione delle stazioni di campionamento (1 - 10).

### *Campagna di campionamento*

La presente indagine è stata svolta tra Marzo ed Ottobre 2010, e si è svolta in quattro campionamenti stagionali (M = Marzo, G = Giugno, A = Agosto, O = Ottobre) in relazione alle caratteristiche idrologiche dei corsi d'acqua mediterranei, caratterizzati da un periodo di flusso normale (ad esempio Marzo e Giugno) e minimo (fino a situazioni di secca, cioè Agosto e Ottobre). Sono state identificate dieci stazioni di campionamento, sei lungo il corso del Fiume Nestore (St. 1-6) e quattro nei principali affluenti (St. 7: Torrente Caina; St. 8: Torrente Genna; St. 9: Torrente Fersinone; St. 10: Torrente Calvana) (Fig. 4.1). Le St. 9 e 10 erano in secca rispettivamente ad Ottobre 2010, e ad Agosto ed Ottobre 2010.

I campioni di macroinvertebrati sono stati raccolti mediante un retino immanicato equipaggiato con una rete con maglie da 335  $\mu\text{m}$ . Il tempo di campionamento standardizzato era di 10 minuti (Ghetti, 1997). I campioni sono stati trasportati in breve tempo in laboratorio per *sorting in vivo*, fissati in alcol al 70% e quindi identificati al livello tassonomico richiesto, utilizzando diverse chiavi tassonomiche (Tachet et al., 2006; Moretti, 1983; Carchini, 1983; Campaioli et al., 1999; Consiglio, 1980; Belfiore, 1983; Sansoni, 1998), e contati.

Sono stati misurati i principali parametri chimico-fisici delle acque e sono stati raccolti campioni di acqua e sedimento.

### *Caratterizzazione chimica e chimico-fisica delle acque superficiali*

I seguenti parametri chimico-fisici delle acque sono stati misurati *in situ*: temperatura, ossigeno disciolto (DO; Ossimetro F-Simplair Syland Scientific, precisione 1% del valore di scala, campo di misura: 0,0 - 20,0  $\text{O}_2 \text{ mg L}^{-1}$ ), pH (pHmetro Hanna Instruments HI-98150, scala: -4,00 - 19,99, risoluzione 0,01 pH, precisione  $\pm 0,02 \text{ pH}$ ) e conducibilità (HI8733-Hanna Instruments, scala: 0 - 1999  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , precisione 1%, risoluzione 1  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ).

Sono stati raccolti campioni di acqua in bottiglie di polietilene da 500 mL e conservati in frigorifero a 5 °C per la successiva caratterizzazione anionica e cationica e per la determinazione del *Chemical Oxygen Demand* (COD). La determinazione del COD è stata effettuata attraverso metodo colorimetrico (Colorimetro Smart 2 La Motte Company, COD Low Range Reagent Kit, 0-150  $\text{mg L}^{-1}$  COD, limite di rilevamento 0,5  $\text{mg L}^{-1}$ ). Le concentrazioni delle specie di anioni e cationi (anioni =  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ; cationi =  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ) sono state determinate attraverso Cromatografia Ionica Soppressa con detector a conducibilità utilizzando un cromatografo Dionex Series 4500i. Sono state utilizzate soluzioni standard (Fluka-TraceCERT®

Standard Solutions,  $1000 \text{ mg L}^{-1} \pm 4 \text{ mg L}^{-1}$ ) in acqua ultrapura ( $18,2 \text{ M}\Omega$  at  $25^\circ\text{C}$ ) per preparare opportuni standard di calibrazione. Le analisi sono state effettuate previa filtrazione dei campioni con filtri di cellulosa ( $0,2 \mu\text{m}$ ) (Selvaggi et al., 2010).

#### *Determinazione dei metalli pesanti nei sedimenti*

La concentrazione dei metalli pesanti (Cr, Cd, Cu, Ni, Zn, Pb) è stata determinata mediante Spettrometria ad Assorbimento Atomico in fiamma (Perkin–Elmer 3300, limite strumentale di rilevazione  $0,01 - 0,20 \text{ mg L}^{-1}$ ). Sono state utilizzate soluzioni standard (Fluka-TraceCERT®,  $1000 \text{ mg L}^{-1} \pm 4 \text{ mg L}^{-1}$ ) in acido nitrico al 2% per preparare appropriati standard di calibrazione.

Tutte le misure dei metalli pesanti nei sedimenti sono basate su due repliche.

Campioni di sedimento sono stati ottenuti dragando lo strato superficiale (ca. 5 cm) dei sedimenti del fondale con una draga manuale. I campioni (500 g) sono stati conservati in bottiglie di polietilene e congelati a  $-18^\circ\text{C}$  (MATT e APAT, 2005).

Tutti i campioni di sedimento sono stati essiccati all'aria, disgregati usando mortaio e pestello e fatti passare attraverso un setaccio con maglie di 2 mm, essiccati a  $105^\circ\text{C}$  per 24h e digeriti come segue: sono stati aggiunti al campione (2,0 g) 15 mL di acido nitrico ultrapuro concentrato (Fluka, TraceSELECT®, per l'analisi di tracce  $\geq 69\%$ ) e la miscela è stata riscaldata a  $160^\circ\text{C}$  per 1h; poi, il recipiente è stato raffreddato a temperatura ambiente e sono stati aggiunti 10 mL di acido cloridrico ultrapuro concentrato (Fluka, TraceSELECT®, per l'analisi di tracce  $\geq 37\%$ ) e il recipiente è stato riscaldato a  $160^\circ\text{C}$  per 1h. La miscela è stata raffreddata, filtrata (filtri Whatman Grade No. 42, porosità  $2,5 \mu\text{m}$ ) e diluita con acqua ultrapura a 50 mL.

#### *I Macroinvertebrati e i tratti biologici/ecologici*

I “Tratti bio-ecologici” costituiscono la maggior parte delle informazioni sulla biologia, sulla fisiologia e sull'ecologia dei taxa di una comunità di macroinvertebrati (Statzner et al., 1994).

Una revisione da parte di Tachet (2010) ha fornito dati riguardanti 11 variabili biologiche e 11 variabili ecologiche (vedi Tabella 4.1 per una visione d'insieme) di più di 500 taxa tipici delle acque dolci europee, identificati ad un livello sistematico sufficiente per descrivere la loro diversità funzionale (“tratti”), di solito a livello di genere (Dolédéc et al., 1998).

Per ogni tratto biologico/ecologico, le categorie (modalità) sono state elencate come ordinali o nominali (Tab. 4.1). Le informazioni sui tratti dei macroinvertebrati (disponibili in Tachet et al., 2010) sono state strutturate utilizzando una tecnica di codifica sfocata: per una data categoria di



un tratto, il punteggio va da “0”, che indica “nessuna affinità”, a “3” o “5”, che indica “alta affinità”.

#### *Analisi statistica*

Come tecnica di ordinamento, è stata utilizzata l'Analisi delle Componenti Principali (PCA) per stabilire le associazioni tra le 24 variabili ambientali (18 variabili fisico-chimiche delle acque; 6 metalli pesanti nei sedimenti) e le 10 stazioni di campionamento.

La matrice delle abbondanze dei macroinvertebrati è stata trasformata logaritmicamente ( $\ln(x+1)$ ) per ridurre il peso dei valori molto alti (Diaz et al., 2008), e successivamente analizzata applicando l'Analisi delle Corrispondenze (CA) e la matrice dei tratti delle specie è stata analizzata applicando l'Analisi di Corrispondenza Sfocata (FCA) (Chevenet et al., 1994). L'analisi simultanea delle due matrici (distribuzione delle specie e matrice dei tratti delle specie) è stata effettuata utilizzando l'Analisi di Co-inerzia (CoA) (Dolédéc e Chessel, 1994). Questa procedura ha permesso di rilevare la co-struttura, massimizzando la covarianza tra i punteggi di ordinamento delle metriche nelle prime due analisi (Dray et al., 2003). Sono state effettuate 100 Analisi di Co-inerzia dei dataset tassonomici e dei tratti delle specie dopo la permutazione casuale delle loro righe. È stato calcolato il coefficiente RV (equivalente multidimensionale del coefficiente di correlazione ordinario tra due variabili; Dolédéc et al., 2006), e sono state elaborate le distribuzioni di frequenza dei 100 valori casuali RV per la co-inerzia tra le due tabelle. Il test risultava significativo quando il valore osservato era in una classe contenente solo alcuni dei 100 possibili valori random e il valore P associato a questo test è stato calcolato (Céréghino et al., 2012). Le analisi sono state effettuate attraverso il pacchetto ADE-4 per la versione del software R (2.7.2) (R Development Core Team, 2008).

**Tabella 4.1** - Trattati biologici (A-K) ed ecologici (L-V), e modalità (= categorie) dei macroinvertebrati d'acqua dolce.

Tratti	Modalità	Codice
A - Taglia massima potenziale	≤ 0.25 cm	a1
	>0.25-0.5 cm	a2
	>0.5-1 cm	a3
	> 1-2 cm	a4
	> 2-4 cm	a5
	> 4-8 cm	a6
	> 8 cm	a7
B - Durata del ciclo biologico	≤ 1 anno	b1
	> 1 anno	b2
C - Numero di cicli riproduttivi per anno	< 1	c1
	1	c2
	> 1	c3
D - Stadi acquatici	uova	d1
	larva	d2
	ninfa	d3
	adulto	d4
E - Riproduzione	ovoviviparità	e1
	uova isolate, libere	e2
	uova isolate, cementate	e3
	masse ovigere, cementate o fisse	e4
	masse ovigere libere	e5
	masse ovigere nella vegetazione	e6
	masse ovigere terrestri	e7
	Riproduzione asessuale	e8
F - Dispersione	acquatica passiva	f1
	acquatica attiva	f2
	aerea passiva	f3
	aerea attiva	f4
G - Forme di resistenza	uova, statoblasti	g1
	bozzoli	g2
	loggette contro il disseccamento	g3
	diapausa o quiescenza	g4
	nessuna	g5
H - Respirazione	tegumento	h1
	branchie	h2
	plastron	h3
	spiracolo	h4
	vescicola idrostatica	h5

**Tabella 4.1** - segue

Tratti	Modalità	Codice
I - Modo di locomozione e relazione al substrato	volatore	i1
	nuotatore in superficie	i2
	nuotatore nello spessore dell'acqua	i3
	strisciante	i4
	scavatore	i5
	interstiziale	i6
	fissato temporaneamente	i7
	fissato permanentemente	i8
J - Tipo di nutrimento	microorganismi	j1
	detriti (< 1mm)	j2
	piante morte ( $\geq$ 1mm)	j3
	microfite viventi	j4
	macrofite viventi	j5
	animali morti ( $\geq$ 1mm)	j6
	microinvertebrati viventi	j7
	macroinvertebrati viventi	j8
	vertebrati	j9
K - Modo di alimentazione	assorbenti	k1
	mangiatori di deposito	k2
	triturator	k3
	raschiatori	k4
	filtratori	k5
	aspiratori	k6
	predatori	k7
	parassiti	k8
L - Distribuzione trasversale	alveo principale	l1
	sponde, para-plesiopotamon	l2
	acque stagnanti, pozze, rami laterali	l3
	paludi, torbiere	l4
	acque temporanee	l5
	laghi	l6
	habitat sotterranei	l7
M - Distribuzione longitudinale	crenon	m1
	epirithron	m2
	metarithron	m3
	iporithron	m4
	epipotamon	m5
	mesopotamon	m6
	estuario	m7
	esterno al sistema fluviale	m8

**Tabella 4.1** - segue

Tratti	Modalità	Codice
N - Altitudine	pianura+collina	n1
	pedemontano	n2
	alpino	n3
O - Regione biogeografica	2: Pirenei	o1
	4: Alpi	o2
	8: Vosgi, Jura, Massiccio Centrale	o3
	13a: bassopiano (oceanico)	o4
	13b: bassopiano (Mediterraneo)	o5
P - Substrato (preferendum)	massi/rocce/ciottoli	p1
	ghiaia	p2
	sabbia	p3
	sabbia fine	p4
	macrofite	p5
	microfite	p6
	radici/rami	p7
	detriti organici/lettiera	p8
	fanghiglia/limo	p9
Q - Velocità di corrente (preferendum)	nulla	q1
	lenta (< 25 cms <sup>-1</sup> )	q2
	media (25-50 cms <sup>-1</sup> )	q3
	alta (> 50 cms <sup>-1</sup> )	q4
R - Grado di trofia (preferendum)	oligotrofico	r1
	mesotrofico	r2
	eutrofico	r3
S - Salinità (preferendum)	acqua dolce	s1
	acqua salmastra	s2
T - Temperature (preferendum)	stenoterme: psicrofile (< 15°C)	t1
	stenoterme: termofile (> 15°C)	t2
	euriterme	t3
U - Saprobietà	xenosaprobiche	u1
	oligosaprobiche	u2
	beta-mesosaprobiche	u3
	alfa-mesosaprobiche	u4
	polisaprobiche	u5
V - pH (preferendum)	≤ 4	v1
	> 4-4.5	v2
	> 4.5-5	v3
	> 5-5.5	v4
	> 5.5-6	v5
	> 6	v5

### 4.3 RISULTATI

#### *Variabili ambientali*

La figura 4.2 mostra l'ordinamento delle 10 stazioni nei 4 campionamenti stagionali sulla base delle 24 variabili ambientali (vedi anche Tabella 4.2, 4.3). I primi due assi della PCA spiegano il 52,44% della varianza totale. Il primo asse (37,22%) mostra il gradiente monte-valle del Fiume Nestore (St. 1 - 6) e i suoi affluenti (St. 7 - 10), secondo il livello dell'alterazione del sistema fluviale. La Stazione 1, le Stazioni 2 e 3 (a Giugno e a Marzo), e le Stazioni 9 e 10, si collocano sul lato destro del grafico (alta qualità ambientale). Le Stazioni 3 (Ottobre ed Agosto), 4, 5, 6, 7 e 8 si collocano nel lato sinistro (bassa qualità ambientale). Inoltre, la variabilità all'interno di ogni stazione è influenzata dalla stagionalità, come è evidente dal primo asse. Infatti, i campionamenti di Marzo e Giugno tendono a spostarsi sul lato destro del grafico (migliore qualità ambientale), mentre quelli di Agosto e Ottobre si spostano a sinistra (peggiore qualità ambientale). Differenze stagionali sono anche evidenti nel secondo asse (15,22%), poiché i campionamenti di Marzo e Giugno sono posizionati principalmente nella zona superiore del grafico e i campionamenti di Ottobre ed Agosto nella zona inferiore (Fig. 4.2a). Il primo asse è positivamente correlato principalmente con pH e DO, e negativamente correlato con nitrati, ammonio, nitriti, fosfati, cloruri, conduttività, COD, piombo e cadmio (Fig. 4.2b).

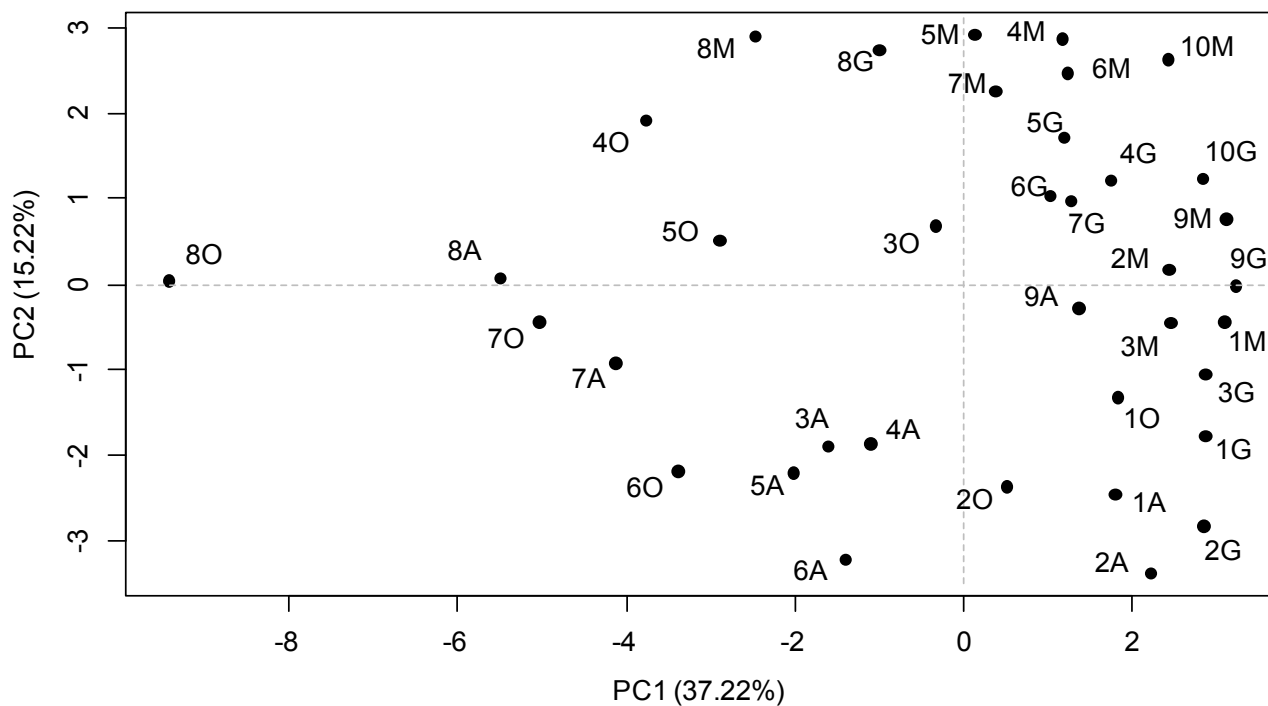
**Tabella 4.2 - Variabili chimiche e fisico-chimiche delle acque e metalli pesanti nei sedimenti nelle stazioni di campionamento nelle varie stagioni nel bacino del Fiume Nestore (St. 1-10): “---”, in secca.**

	St. 1 - Nestore				St. 2 - Nestore				St. 3 - Nestore				St. 4 - Nestore				St. 5 - Nestore				
	Mar	Giu	Ago	Ott	Ott	Mar	Giu	Ago	Ott	Mar	Giu	Ago	Ott	Mar	Giu	Ago	Ott	Mar	Giu	Ago	Ott
Parametri fisico-chimici delle acque																					
T acqua (°C)	6,00	12,60	20,40	13,50	7,40	13,80	27,30	15,00	7,50	14,50	26,40	14,70	7,50	14,40	25,90	15,60	7,70	14,70	24,10	15,60	15,60
Conducibilità (µS cm <sup>-1</sup> )	467	431	537	540	505	443	521	652	593	506	785	744	727	638	636	890	739	638	556	796	796
pH	8,43	8,41	8,10	8,20	8,65	8,40	8,54	8,62	8,42	8,34	7,66	7,96	8,16	8,27	8,03	8,00	8,11	8,14	7,78	8,01	8,01
DO (mg L <sup>-1</sup> )	10,30	10,90	8,10	9,00	11,60	9,80	19,40	12,80	11,90	10,80	5,60	8,30	11,20	10,40	8,50	7,40	9,80	8,80	6,90	7,40	7,40
COD (mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub> )	7,00	<5,00	<5,00	13,00	<5,00	<5,00	<5,00	13,00	5,00	8,00	14,00	9,00	<5,00	<5,00	20,00	16,00	9,00	<5,00	22,00	6,00	6,00
Fluoruri (mg L <sup>-1</sup> )	0,60	<0,20	0,71	<0,20	0,66	0,72	0,73	0,68	0,61	<0,20	0,63	0,67	0,60	0,73	0,70	0,62	0,67	0,75	0,68	2,17	2,17
Cloruri (mg L <sup>-1</sup> )	22,21	17,89	33,42	47,49	27,59	22,40	56,88	79,45	29,31	20,51	60,81	64,25	39,64	22,07	59,30	92,77	43,10	22,54	55,44	92,54	92,54
Nitriti (mg L <sup>-1</sup> )	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	1,34	<0,10	0,64	0,41	0,81	<0,10	0,78	0,70	1,21	<0,10	<0,10
Bromuri (mg L <sup>-1</sup> )	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	0,11	<0,10	<0,10	0,45	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
Nitrati (mg L <sup>-1</sup> )	2,59	1,50	1,09	1,38	7,54	2,21	3,00	9,95	7,36	2,89	2,17	17,38	17,49	12,18	7,78	29,01	22,42	14,90	8,86	30,63	30,63
Fosfati (mg L <sup>-1</sup> )	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20	0,93	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20	1,08	<0,20	<0,20	0,68	1,64	1,64
Solfati (mg L <sup>-1</sup> )	19,69	15,20	16,57	17,75	25,48	18,10	24,03	25,79	33,68	22,84	45,87	47,30	70,44	46,18	58,87	78,85	65,84	43,10	53,20	53,65	53,65
Litio (mg L <sup>-1</sup> )	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50
Sodio (mg L <sup>-1</sup> )	16,86	15,34	21,43	22,99	26,93	20,20	40,73	51,17	27,99	21,47	55,38	49,09	31,53	22,25	44,64	60,99	32,88	22,65	39,73	63,83	63,83
Ammonio (mg L <sup>-1</sup> )	<0,10	<0,10	0,13	0,11	1,26	0,65	0,37	0,38	1,69	0,69	0,88	0,33	1,58	0,70	0,36	5,38	4,01	2,38	2,59	0,44	0,44
Potassio (mg L <sup>-1</sup> )	1,04	1,21	1,07	1,09	5,53	1,51	2,16	2,16	2,65	1,41	4,36	2,76	2,95	2,44	5,41	7,77	3,50	3,39	6,82	7,77	7,77
Magnesio (mg L <sup>-1</sup> )	11,52	9,95	13,83	13,39	14,30	12,84	15,25	15,40	18,14	16,99	17,49	17,73	22,30	20,36	12,77	14,37	21,04	19,50	10,67	14,37	14,37
Calcio (mg L <sup>-1</sup> )	94,72	85,36	83,66	93,31	98,70	72,12	67,76	87,93	100,04	79,58	90,94	103,63	112,65	107,65	82,98	96,11	118,30	107,65	65,33	103,12	103,12
Metalli pesanti nei sedimenti																					
Cr (mg Kg <sup>-1</sup> )	25,89	20,95	37,81	30,66	27,30	49,66	41,29	34,97	53,99	32,07	45,61	16,90	16,15	14,45	16,66	16,09	16,13	8,10	13,54	12,04	12,04
Cd (mg Kg <sup>-1</sup> )	<0,75	2,22	2,56	<0,75	<0,75	<0,75	2,70	2,04	<0,75	<0,75	2,85	<0,75	<0,75	<0,75	2,88	<0,75	<0,75	<0,75	3,36	2,04	2,04
Cu (mg Kg <sup>-1</sup> )	6,50	12,03	12,62	8,34	10,11	31,74	22,21	28,44	24,08	14,27	22,36	8,79	10,51	24,25	21,45	10,98	13,92	22,64	17,98	10,75	10,75
Ni (mg Kg <sup>-1</sup> )	38,15	42,56	46,43	42,99	36,76	62,26	44,19	69,34	53,34	41,80	43,29	42,37	35,89	45,19	47,61	40,75	40,47	40,72	35,37	39,29	39,29
Zn (mg Kg <sup>-1</sup> )	41,67	59,41	46,88	61,65	82,77	163,49	74,87	195,56	104,04	63,00	66,47	79,11	80,58	97,36	73,14	82,04	98,91	80,72	63,73	78,85	78,85
Pb (mg Kg <sup>-1</sup> )	11,20	13,96	19,64	26,87	9,16	23,33	22,18	45,24	22,06	13,81	21,88	34,37	10,46	16,70	24,88	35,89	16,59	<0,50	23,95	34,08	34,08

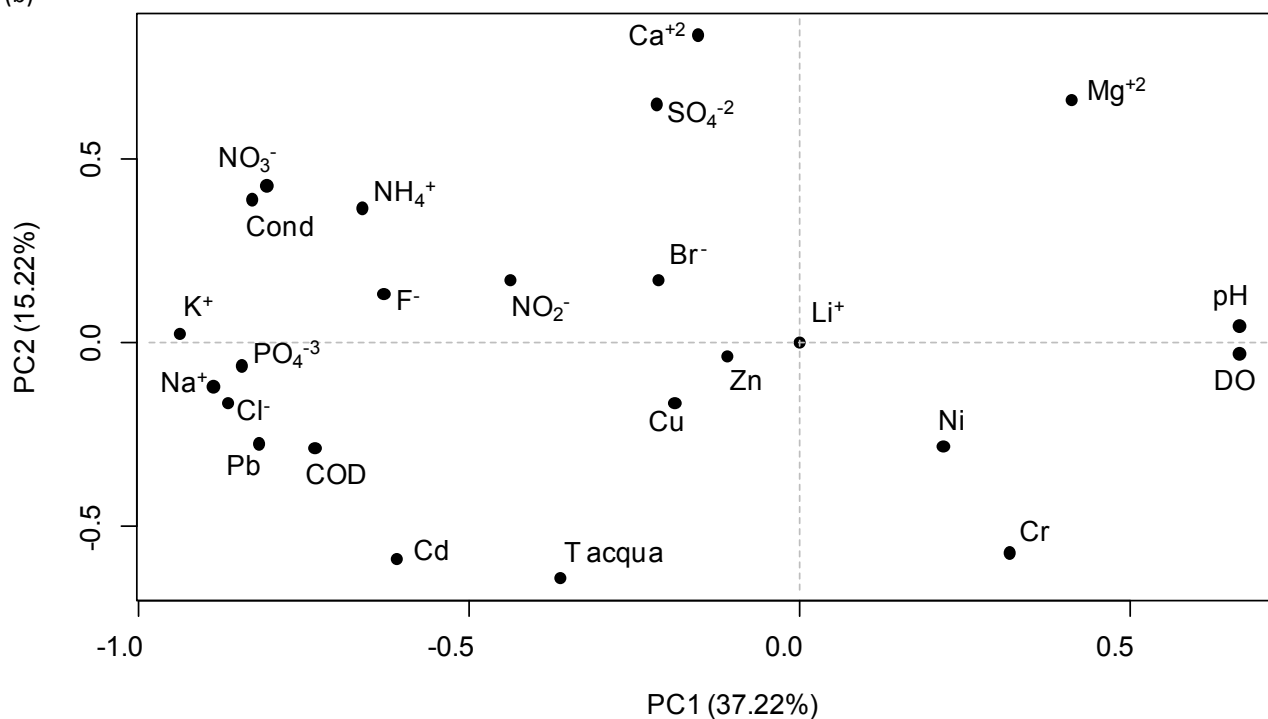
Tabella 4.3 - segue

	St. 6 - Nestore				St. 7 - Caina				St. 8 - Genna				St. 9 - Fersinone				St. 10 - Calvana			
	Mar	Giu	Ago	Ott	Mar	Giu	Ago	Ott	Mar	Giu	Ago	Ott	Mar	Giu	Ago	Ott	Mar	Giu	Ago	Ott
Parametri fisico-chimici delle acque																				
T acqua (°C)	6,90	13,80	23,30	15,50	7,50	14,60	22,20	16,00	8,30	15,00	21,40	15,20	6,70	13,00	21,60	---	7,60	13,10	---	---
Conducibilità (µS cm <sup>-1</sup> )	672	593	528	750	729	689	805	924	844	771	783	881	541	497	553	---	613	605	---	---
	8,28	8,27	7,91	8,18	8,28	8,21	7,86	8,07	8,27	8,16	7,73	7,88	8,37	8,40	7,75	---	8,30	8,46	---	---
pH	8,28	8,27	7,91	8,18	8,28	8,21	7,86	8,07	8,27	8,16	7,73	7,88	8,37	8,40	7,75	---	8,30	8,46	---	---
DO (mg L <sup>-1</sup> )	11,50	9,80	8,00	9,30	10,60	9,60	5,70	8,10	9,40	8,50	4,30	4,90	11,50	9,80	7,00	---	11,30	11,50	---	---
COD (mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub> )	<5,00	22,00	14,00	37,00	12,00	<5,00	20,00	26,00	<5,00	8,00	16,00	31,00	<5,00	7,00	<5,00	---	<5,00	<5,00	---	---
Fluoruri (mg L <sup>-1</sup> )	0,63	0,68	<0,20	1,97	0,84	0,60	0,61	2,67	0,81	3,43	0,65	6,94	0,14	0,54	0,65	---	1,36	1,50	---	---
Cloruri (mg L <sup>-1</sup> )	32,22	18,94	46,89	79,03	37,03	22,85	83,85	102,55	66,45	40,77	71,76	95,96	13,25	10,02	19,53	---	14,82	11,31	---	---
Nitriti (mg L <sup>-1</sup> )	0,64	0,50	1,00	<0,10	1,40	0,50	2,04	<0,10	2,48	1,29	3,91	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	---	<0,10	<0,10	---	---
Bromuri (mg L <sup>-1</sup> )	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	---	<0,10	<0,10	---	---
Nitrati (mg L <sup>-1</sup> )	15,99	11,59	7,70	28,73	20,99	14,11	18,91	34,26	43,34	31,10	25,46	66,81	2,58	0,77	2,22	---	5,64	4,31	---	---
Fosfati (mg L <sup>-1</sup> )	<0,20	<0,20	<0,20	1,50	<0,20	<0,20	3,00	1,72	0,46	<0,20	3,92	5,48	<0,20	<0,20	<0,20	---	<0,20	<0,20	---	---
Solfati (mg L <sup>-1</sup> )	67,15	44,38	44,48	49,40	63,31	53,75	49,49	45,73	61,67	51,16	45,97	46,70	49,52	36,05	66,25	---	108,90	83,03	---	---
Litio (mg L <sup>-1</sup> )	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	---	<0,50	<0,50	---	---
Sodio (mg L <sup>-1</sup> )	25,98	20,05	35,06	56,17	29,91	22,11	65,15	81,54	49,58	33,65	58,29	68,23	13,55	11,84	17,97	---	17,19	13,95	---	---
Ammonio (mg L <sup>-1</sup> )	2,98	1,84	2,81	0,44	2,40	1,12	1,58	0,60	5,64	2,55	5,30	8,02	0,35	0,16	<0,10	---	0,47	<0,10	---	---
Potassio (mg L <sup>-1</sup> )	3,14	3,28	6,60	7,70	3,25	2,65	7,18	9,35	7,93	3,89	9,01	12,03	1,87	1,22	1,80	---	1,96	1,74	---	---
Magnesio (mg L <sup>-1</sup> )	20,74	20,79	10,35	14,07	20,67	20,92	11,35	14,80	16,52	15,88	10,49	12,48	19,08	17,38	21,29	---	24,46	21,10	---	---
Calcio (mg L <sup>-1</sup> )	112,15	114,62	70,49	100,91	113,82	118,00	93,77	111,71	126,20	144,02	99,89	104,02	94,87	90,82	82,07	---	106,58	111,69	---	---
Metalli pesanti nei sedimenti																				
Cr (mg Kg <sup>-1</sup> )	17,42	20,15	25,89	32,97	18,12	22,76	15,40	18,18	18,49	19,47	16,47	18,53	19,68	20,75	18,94	---	21,30	24,98	---	---
Cd (mg Kg <sup>-1</sup> )	<0,75	<0,75	4,36	2,96	<0,75	<0,75	2,16	2,87	1,82	<0,75	1,30	4,61	<0,75	<0,75	<0,75	---	<0,75	<0,75	---	---
Cu (mg Kg <sup>-1</sup> )	21,46	30,20	35,71	44,84	28,31	57,37	30,92	28,07	17,51	14,70	27,18	27,14	17,20	17,95	26,13	---	22,66	34,54	---	---
Ni (mg Kg <sup>-1</sup> )	41,92	48,75	47,72	72,13	46,68	52,85	37,54	46,63	43,78	34,95	33,19	39,70	48,45	42,88	52,62	---	50,08	68,87	---	---
Zn (mg Kg <sup>-1</sup> )	116,40	115,46	101,27	160,46	113,84	248,88	118,35	117,96	84,52	71,37	79,31	106,29	71,27	68,51	83,18	---	64,91	118,32	---	---
Pb (mg Kg <sup>-1</sup> )	16,47	10,90	36,88	53,45	21,95	24,30	31,62	56,06	26,90	19,43	49,38	65,34	17,32	<0,50	31,81	---	17,95	9,39	---	---

(a)



(b)



**Figura 4.2** - Primi due assi dell'Analisi delle Componenti Principali (PCA) svolta sulle 24 variabili ambientali misurate nelle 10 stazioni di campionamento nelle varie stagioni (St. 1- 6: Fiume Nestore; St. 7: Torrente Caina; St. 8: Torrente Genna; St. 9: Torrente Fersinone; St. 8: Torrente Calvana). Le stazioni di campionamento nelle varie stagioni **(a)** e variabili ambientali **(b)** sono rappresentate sui primi due assi della PCA. (M = Marzo, G = Giugno, A = Agosto, O = Ottobre).

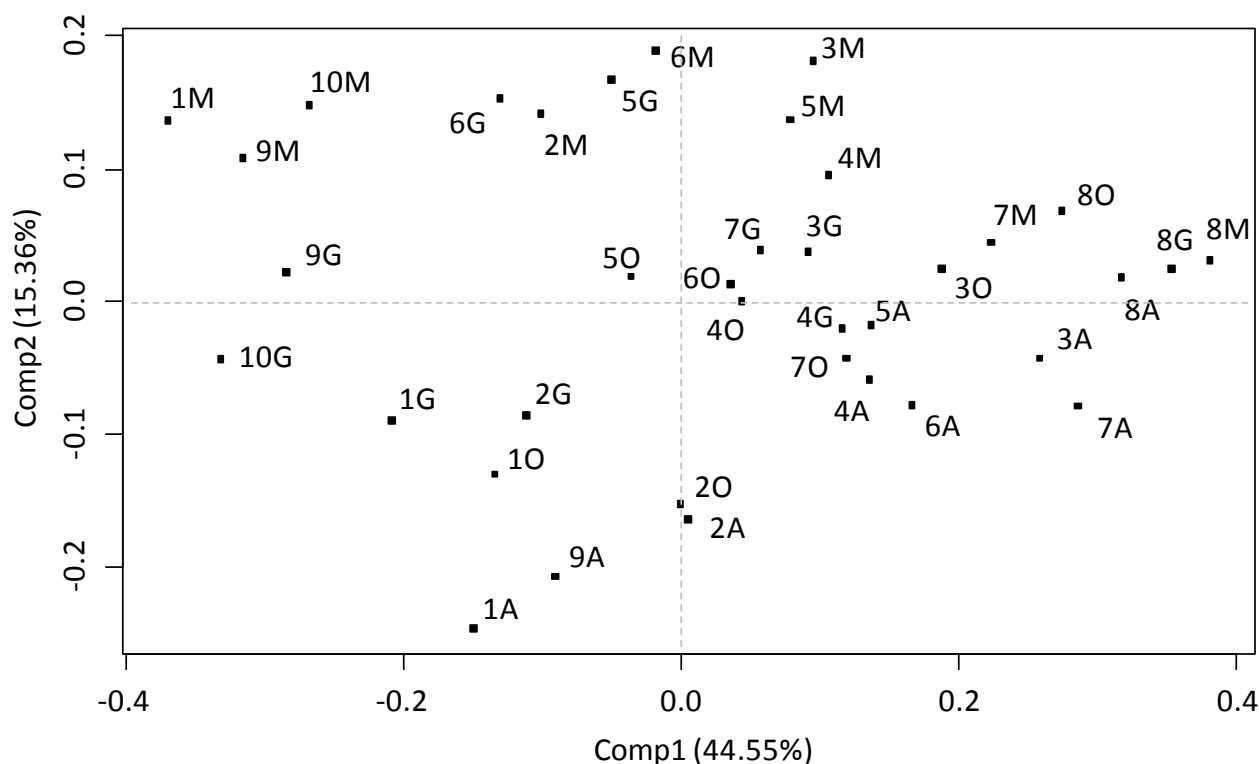


*Macroinvertebrati e modelli spaziali dei tratti biologici/ecologici*

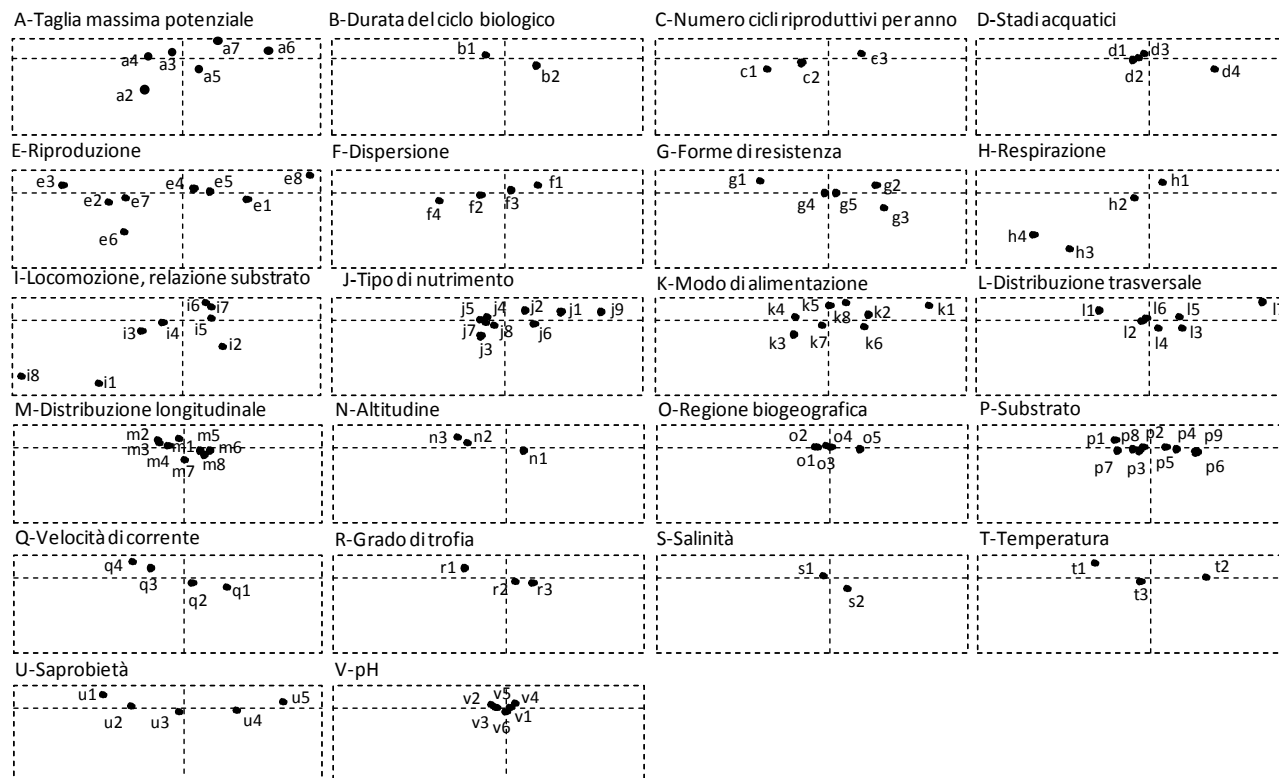
I macroinvertebrati raccolti durante l'indagine sul bacino del Fiume Nestore ammontavano a 37429 individui appartenenti a 91 taxa (anno 2010: 10 stazioni e 37 campionamenti stagionali) (Tab. 4.4). L'Analisi di Co-inerzia (Fig. 4.3) delle matrici delle distribuzioni delle specie e dei tratti delle specie ha rivelato alcuni modelli spaziali all'interno del sistema fluviale del Fiume Nestore. Un test di permutazione ha indicato che la co-inerzia tra queste due matrici è altamente significativa ( $RV = 0,32$ ;  $P < 0,01$ ). I primi due assi della CoA spiegano il 59,91% della varianza totale. Il primo asse (44,55%) è caratterizzato dalla qualità ecologia dei siti di campionamento; le Stazioni 1 - 2 e 9 - 10 ricadono nel lato sinistro del grafico (alta qualità ecologica), mentre le Stazioni 3 - 6 e 7 - 8 tendono a ricadere sulla destra (bassa qualità ecologica). La stagionalità caratterizza il secondo asse (15,36%), con i campionamenti di Marzo e Giugno che tendono a ricadere nella parte superiore del grafico ed i campionamenti di Ottobre ed Agosto nella parte inferiore (Fig. 4.3a).

I tratti biologici/ecologici hanno permesso di costruire gli *scatterplot* (Fig. 4.3b). Nello specifico, sulla sinistra di ogni *scatterplot*, i tratti (Tab. 4.1) illustrano i macroinvertebrati che esprimono particolari categorie (Tab. 4.1): numero di cicli riproduttivi per anno  $\leq 1$  (c1 or c2); uova isolate, cementate (e3) o libere (e2) come metodo di riproduzione; dispersione aerea attiva (f4) o acquatica attiva (f2); uova e statoblasti come forme di resistenza (g1); respirazione attraverso spiracoli (h4) e plastron (h3); organismi fissati permanentemente (i8) come relazione con il substrato; trituratori (k3) e raschiatori (k4) come modo di alimentazione; organismi che vivono nell'alveo principale (l1); preferenza per i substrati di massi/rocce/ciottoli (p1) e radici/rami (p7); preferenza per velocità di corrente medio-alta ( $> 25 \text{ cm s}^{-1}$ ) (q3 o q4); habitat con basso input organico (r1 e u1 o u2); preferenza per temperature più basse ( $< 15^\circ\text{C}$ ) (t1). Sulla destra di ogni *scatterplot* (Fig. 4.3), i tratti caratterizzano principalmente i taxa con corpi di taglia grande ( $> 4\text{-}8 \text{ cm}$ ) (a6); numero di cicli per anno  $> 1$  (c3); stadi adulti acquatici (d4); riproduzione asessuale (e8); dispersione acquatica passiva (f1); capacità di formare bozzoli (g2) e loggette contro il disseccamento (g3) come forme di resistenza; consumatori di microrganismi (j1) e vertebrati (j9); come modo di alimentazione, assorbenti (k1), mangiatori di deposito (k2) o aspiratori (k6); preferenza per substrati fangosi (p9) o a microfite (p6); preferenza per velocità di corrente nulla (q1) o  $< 25 \text{ cm s}^{-1}$  (q2); habitat con alto input organico (r3 e u4 o u5); preferenza per temperature più alte ( $> 15^\circ\text{C}$ ) (t2).

(a)



(b)



**Figura 4.3** - Primi due assi dell'Analisi di Co-inerzia (CoA) effettuate sulle matrici: abbondanze dei macroinvertebrati trasformate logaritmicamente e tratti biologici/ecologici. **(a)** Ordinamento delle stazioni di campionamento nelle varie stagioni; **(b)** distribuzione delle categorie dei tratti delle specie. Le categorie sono posizionate a seconda della media ponderata della stessa specie. (M = Marzo, G = Giugno, A = Agosto, O = Ottobre).

**Tabella 4.4** - Comunità bentonica (91 taxa) del bacino del Fiume Nestore nelle 10 stazioni di campionamento nelle varie stagioni “---”, in secca.

Taxa/Campionamenti	St. 1 - Nestore				St. 2 - Nestore				St. 3 - Nestore				St. 4 - Nestore				St. 5 - Nestore			
	Mar	Giu	Ago	Ott	Mar	Giu	Ago	Ott	Mar	Giu	Ago	Ott	Mar	Giu	Ago	Ott	Mar	Giu	Ago	Ott
Turbellaria																				
<i>Dugesia</i> sp.	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nematoda																				
Mermithidae indet.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nematomorpha																				
<i>Gordius</i> sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gastropoda																				
<i>Bithynia</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Potamopyrgus</i> sp.	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lymnaea</i> sp.	0	0	7	0	0	2	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Radix</i> sp.	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Physa acuta</i>	0	0	0	0	0	0	20	11	8	6	39	11	3	0	0	11	1	0	5	6
<i>Ancylus</i> sp.	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
<i>Gyraulus</i> sp.	0	0	0	0	0	0	16	39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bivalvia																				
<i>Pisidium</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Anodonta anatina</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	2	0	0	0	0
Oligochaeta																				
<i>Haplotaxis gordioides</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	1	0	0	0
<i>Eiseniella tetraedra</i>	4	19	1	32	1	2	0	2	1	0	0	0	6	3	1	3	3	0	0	1
<i>Branchiura sowerbyi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tubificidae indet.	0	0	0	0	10	0	1	27	5895	56	456	236	538	18	16	19	302	5	56	27
Hirudinea																				
<i>Dina lineata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	3	14	63	19	34	146	50	8	16	167
<i>Trocheta</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Helobdella stagnalis</i>	0	0	0	0	2	0	2	1	8	3	10	14	2	1	0	2	1	0	1	0
Crustacea																				
<i>Proasellus coxalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	12	0	0	1	3	1	0
<i>Procambarus clarkii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Echinogammarus</i> sp.	4	104	74	239	1	0	0	1	0	2	0	0	1	33	12	16	0	1	0	0
<i>Potamon fluviatile</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ephemeroptera																				
<i>Baetis</i> sp.	8	84	8	2	2	13	0	3	28	29	1	14	68	16	0	21	29	14	2	44
<i>Cloëon</i> gr. dipterum	0	0	33	0	0	0	0	0	0	0	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Caenis</i> sp.	0	3	66	0	0	0	6	0	0	0	2	0	1	9	16	1	0	0	8	0
<i>Serratella ignita</i>	0	17	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ecdyonurus</i> gr. venosus	7	13	2	31	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Choroterpes picteti</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Habrophlebia eldae</i>	0	122	26	0	2	11	0	0	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Paraleptophlebia submarginata</i>	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Odonata																				
<i>Calopteryx splendens</i>	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	4	7	0	0	1	0
<i>Lestes viridis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Platycnemis pennipes</i>	0	0	2	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ischnura elegans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Onychogomphus forcipatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Orthetrum brunneum</i>	0	0	0	0	0	0	2	21	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Plecoptera																				
<i>Capnia</i> sp.	38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
<i>Siphonoperla torrentium</i>	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Leuctra</i> sp.	0	1	0	0	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Nemoura cinerea</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Protonemura ausonia</i>	0	7	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Isoperla andreinii</i>	109	2	0	0	5	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Brachyptera risi</i>	148	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0

Tabella 4.4 - segue

Taxa/Campionamenti	St. 6 - Nestore				St. 7 - Caina				St. 8 - Genna				St. 9 - Fersinone				St. 10 - Calvana			
	Mar	Giu	Ago	Ott	Mar	Giu	Ago	Ott	Mar	Giu	Ago	Ott	Mar	Giu	Ago	Ott	Mar	Giu	Ago	Ott
Turbellaria																				
<i>Dugesia</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
Nematoda																				
Mermitidae indet.	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	---	2	0	---	---
Nematomorpha																				
<i>Gordius</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	---	0	0	---	---
Gastropoda																				
<i>Bithynia</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
<i>Potamopyrgus</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	20	---	0	0	---	---
<i>Lymnaea</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	32	---	0	0	---	---
<i>Radix</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
<i>Physa acuta</i>	0	0	26	14	40	0	13	10	4	0	0	0	0	0	1	---	0	0	---	---
<i>Ancylus</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
<i>Gyraulus</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
Bivalvia																				
<i>Pisidium</i> sp.	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
<i>Anodonta anatina</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
Oligochaeta																				
<i>Haplotaxis gordioides</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	24	0	---	---
<i>Eiseniella tetraedra</i>	5	0	0	0	1	0	0	0	7	1	0	0	1	1	1	---	0	0	---	---
<i>Branchiura sowerbyi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
Tubificidae indet.	124	0	57	31	700	14	137	48	4060	804	239	566	0	0	1	---	0	0	---	---
Hirudinea																				
<i>Dina lineata</i>	8	31	92	90	24	48	50	65	5	14	14	23	0	1	1	---	0	0	---	---
<i>Trocheta</i> sp.	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
<i>Helobdella stagnalis</i>	1	0	3	0	1	1	4	0	2	0	5	4	0	0	0	---	0	0	---	---
Crustacea																				
<i>Proasellus coxalis</i>	0	0	0	0	8	13	38	18	82	235	304	165	0	0	1	---	0	0	---	---
<i>Procambarus clarkii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
<i>Echinogammarus</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
<i>Potamon fluviatile</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
Ephemeroptera																				
<i>Baetis</i> sp.	126	34	0	9	1	29	0	36	0	0	0	0	13	0	0	---	4	55	---	---
<i>Cloëon</i> gr. dipterum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
<i>Caenis</i> sp.	0	0	17	0	0	30	7	3	0	1	0	0	38	3	1	---	13	1	---	---
<i>Serratella ignita</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	---	0	10	---	---
<i>Ecdyonurus</i> gr. venosus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	1	---	0	5	---	---
<i>Choroterpes picteti</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	---	0	0	---	---
<i>Habrophlebia eldae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	10	---	0	3	---	---
<i>Paraleptophlebia submarginata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
Odonata																				
<i>Calopteryx splendens</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
<i>Lestes viridis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
<i>Platycnemis pennipes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	---	0	0	---	---
<i>Ischnura elegans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
<i>Onychogomphus forcipatus</i>	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	6	3	1	---	0	0	---	---
<i>Orthetrum brunneum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
Plecoptera																				
<i>Capnia</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	35	0	0	---	0	0	---	---
<i>Siphonoperla torrentium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
<i>Leuctra</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6	---	3	2	---	---
<i>Nemoura cinerea</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
<i>Protonemura ausonia</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	---	2	1	---	---
<i>Isoperla andreinii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	45	0	0	---	12	0	---	---
<i>Brachyptera risi</i>	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	419	0	0	---	98	0	---	---

Tabella 4.4 - segue

Taxa/Campionamenti	St. 1 - Nestore				St. 2 - Nestore				St. 3 - Nestore				St. 4 - Nestore				St. 5 - Nestore			
	Mar	Giu	Ago	Ott	Mar	Giu	Ago	Ott	Mar	Giu	Ago	Ott	Mar	Giu	Ago	Ott	Mar	Giu	Ago	Ott
<b>Heteroptera</b>																				
<i>Hydrometra</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Nepa</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Velia</i> sp.	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Coleoptera</b>																				
<i>Donacia</i> sp.	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Dryops</i> sp.	0	0	0	18	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pomatinus substriatus</i>	0	7	17	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	31
<i>Agabus</i> sp.	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Coelambus</i> sp.	0	3	3	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Copelatus</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Deronectes moestus</i>	0	5	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Laccophilus</i> sp.	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Elmis</i> sp.	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Esolus</i> sp.	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Limnius</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Stenelmis</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Gyrinus</i> sp.	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Halipus</i> sp.	0	2	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Helophorus</i> sp.	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Hydraena</i> sp.	0	0	15	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Hydrobius fuscipes</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Hydrochara caraboides</i>	0	3	4	0	0	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Spercheus</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Megaloptera</b>																				
<i>Sialis fuliginosa</i>	0	0	3	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Diptera</b>																				
<i>Atherix</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Ceratopogonidae indet.	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Chironomini indet.	0	145	18	14	0	598	12	20	0	416	802	4	9	38	11	2	3	28	58	3
Orthoclaadiinae indet.	68	24	2	2	380	123	8	4	658	18	2	0	102	7	0	7	35	14	0	2
Tanypodinae indet.	0	23	7	0	0	3	2	1	2	2	2	0	3	0	2	0	0	1	0	0
Tanytarsini indet.	0	32	10	1	0	48	231	54	1	16	47	3	7	22	8	0	5	10	8	3
Hexatomini indet.	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Limoniini indet.	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muscidae indet.	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pediciini indet.	1	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Psychodidae indet.	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Prosimulium</i> sp.	5	93	0	0	1	216	2	35	174	5	0	28	18	2	0	28	9	813	0	85
Tabanidae indet.	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Tipulidae indet.	1	4	3	3	0	18	2	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<b>Trichoptera</b>																				
<i>Silo mediterraneus</i>	1	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Hydropsyche</i> sp.	4	0	4	245	0	3	0	3	0	0	0	1	10	17	136	570	34	68	245	169
<i>Mystacides azurea</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Halesus appenninus</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Limnephilus</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Potamophylax gambaricus</i>	12	16	6	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Wormaldia occipitalis</i>	2	42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Plectrocnemia conspersa</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhyacophila italica</i>	10	19	1	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sericostoma</i> sp.	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabella 4.4 - segue

Taxa/Campionamenti	St. 6 - Nestore				St. 7 - Caina				St. 8 - Genna				St. 9 - Fersinone				St. 10 - Calvana			
	Mar	Giu	Ago	Ott	Mar	Giu	Ago	Ott	Mar	Giu	Ago	Ott	Mar	Giu	Ago	Ott	Mar	Giu	Ago	Ott
Heteroptera																				
<i>Hydrometra</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	1	---	---
<i>Nepa</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	---	0	0	---	---
<i>Velia</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
Coleoptera																				
<i>Donacia</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	---	0	2	---	---
<i>Dryops</i> sp.	0	0	0	5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
<i>Pomatinus substriatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	1	---	---
<i>Agabus</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	1	---	---
<i>Coelambus</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	---	0	0	---	---
<i>Copelatus</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	1	---	---
<i>Deronectes moestus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
<i>Laccophilus</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
<i>Elmis</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
<i>Esolus</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
<i>Limnius</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
<i>Stenelmis</i> sp.	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
<i>Gyrinus</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
<i>Halipus</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
<i>Helophorus</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
<i>Hydraena</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	---	1	0	---	---
<i>Hydrobius fuscipes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
<i>Hydrochara caraboides</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
<i>Spercheus</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	---	0	0	---	---
Megaloptera																				
<i>Sialis fuliginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	---	0	0	---	---
Diptera																				
<i>Atherix</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
Ceratopogonidae indet.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	---	19	0	---	---
Chironomini indet.	9	9	42	1	0	66	33	2	50	3633	1013	2710	3	1	6	---	6	0	---	---
Orthoclaadiinae indet.	237	18	0	1	31	8	0	0	3	0	0	0	145	0	2	---	614	1	---	---
Tanypodinae indet.	2	0	1	0	3	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	---	2	0	---	---
Tanytarsini indet.	5	11	0	1	4	84	2	3	0	0	0	0	0	0	0	---	0	2	---	---
Hexatomini indet.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	---	5	0	---	---
Limoniini indet.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
Muscidae indet.	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
Pediciini indet.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
Psychodidae indet.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	---	0	0	---	---
<i>Prosimulium</i> sp.	27	105	0	30	6	38	0	6	2	10	25	148	78	0	0	---	52	0	---	---
Tabanidae indet.	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	1	---	---
Tipulidae indet.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	---	2	0	---	---
Trichoptera																				
<i>Silo mediterraneus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
<i>Hydropsyche</i> sp.	61	45	166	84	0	0	3	1	0	0	0	0	3	16	4	---	4	18	---	---
<i>Mystacides azurea</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
<i>Halesus appenninus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
<i>Limnephilus</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	---	0	0	---	---
<i>Potamophylax gambaricus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	---	0	0	---	---
<i>Wormaldia occipitalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	---	0	0	---	---
<i>Plectrocnemia conspersa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---
<i>Rhyacophila italica</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	19	1	---	13	67	---	---
<i>Sericostoma</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	0	0	---	---

#### 4.4 DISCUSSIONE

Il presente studio ha utilizzato due differenti approcci per la caratterizzazione dello stato ambientale di un bacino fluviale. Questi differiscono in termini di database analizzato, ossia variabili chimiche da una parte e tratti biologici/ecologici dall'altra. L'analisi basata solamente sulle variabili chimiche rileva un *range* di variazione stagionale più ampio alle stazioni inquinate rispetto a quelle che non lo sono (vedi primo asse in Fig. 4.2a). Questo risultato è particolarmente evidente per le stazioni più a valle, cioè 3, 4, 5 e 6 del Fiume Nestore e, maggiormente, per le stazioni collocate sugli affluenti inquinati (stazioni 7 e 8). Questa variabilità stagionale indica che gli inquinanti sono soggetti alle dinamiche attive del regime idrologico del bacino fluviale studiato. Oltretutto, nelle stazioni soggette ad alti livelli di inquinamento, in particolare la Stazione 8, il *range* di variabilità stagionale rivelato dall'analisi biologica della comunità bentonica è stretto (vedi primo asse Fig. 4.3a). In questi siti alterati, questo fenomeno è coerente con l'omogeneità dell'assemblaggio dei macroinvertebrati, che è essenzialmente costituito da un limitato numero di taxa tolleranti (come tubificidi, sanguisughe, asellidi, chironomidi e simuliidi; Tab. 4.4), indipendentemente dalla stagione idrologica. Al contrario, nelle stazioni che mostravano un'alta qualità ecologica (Stazioni 1 e 9), i dati biologici rivelavano un'ampia variabilità stagionale. Questa variabilità si manifesta come un incremento nella biodiversità bentonica (ad esempio 56 taxa alla St. 1 contro 15 taxa alla St. 8; Tab. 4.4), ed è anche correlata alla maggiore variabilità dell'habitat delle diverse fasi idrologiche (stagione umida e stagione secca) del bacino del Fiume Nestore. Ciò nonostante, la composizione dei tratti si è rivelata relativamente stabile da una stagione all'altra in confronto con la variabilità della composizione tassonomica e dell'abbondanza della comunità di macroinvertebrati (Bêche et al., 2006; Bonada et al., 2007a, 2007b). In sintesi, le analisi chimiche e le analisi biologiche, mostrano *range* differenti, ma complementari, di risposta stagionale come funzione del livello di inquinamento. È interessante notare che, secondo le coordinate medie dei mesi lungo il secondo asse, entrambe le analisi hanno rivelato lo stesso *trend* stagionale, con il seguente ordine (Fig. 4.4a): Marzo, Giugno, Ottobre e Agosto. Questo gradiente riflette essenzialmente il regime idrologico del bacino fluviale, che influenza la struttura e il ciclo vitale degli assemblaggi di macroinvertebrati.

Queste caratteristiche suggeriscono che l'analisi concertata dei dati biologici con quelli chimici potrebbe essere più efficace dell'analisi dei singoli *dataset*. Ad esempio, le stazioni di campionamento analizzate sulla base sia delle variabili chimiche che dei dati biologici, hanno

mostrato un *trend* simile nella sequenza dell'alterazione progressiva all'interno del bacino (Fig. 4.2a, 4.3a).

È risultato che l'approccio basato sui tratti biologici ed ecologici è più efficace nel rivelare l'alterazione dovuta agli inquinanti a basse concentrazioni, quando questi sono molto più difficili da rilevare attraverso un approccio chimico, specialmente se dipendono da carichi variabili stagionalmente (Liess et al., 2008; Archaimbault et al., 2010; Liess e Beketov, 2011).

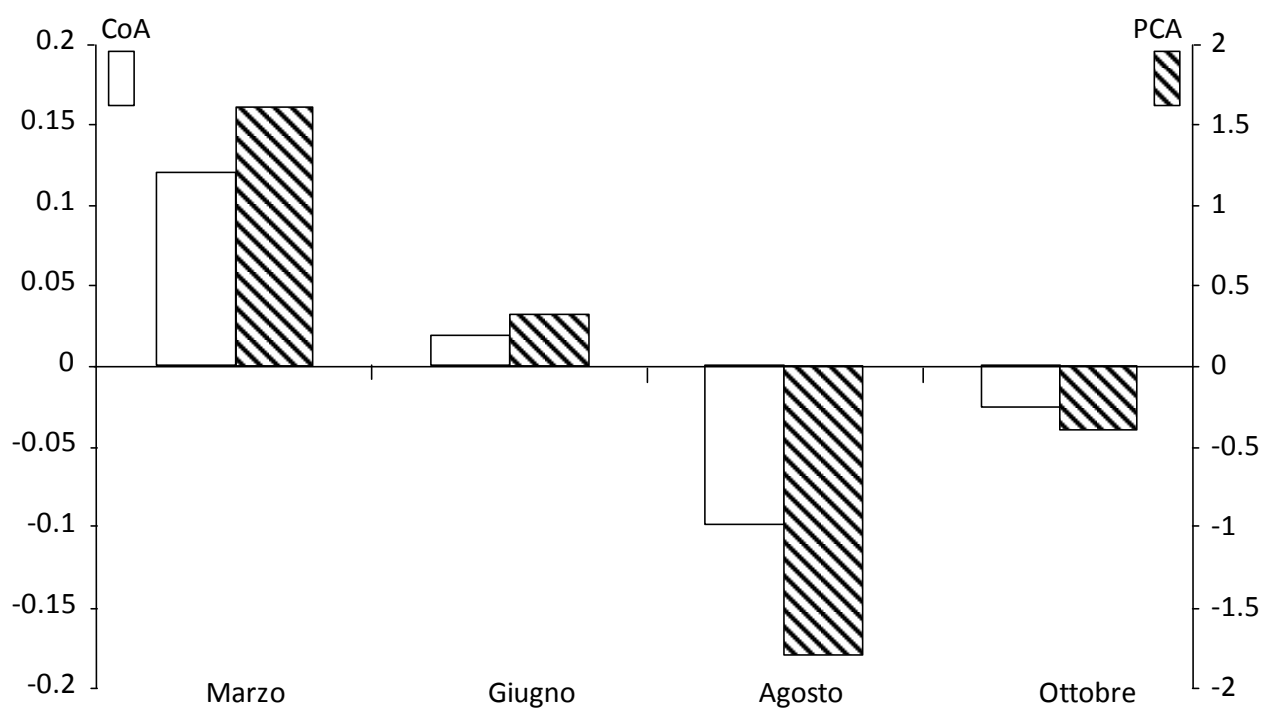
Ciò nonostante, secondo le coordinate medie delle stazioni lungo il primo asse (gradiente di inquinamento) dell'analisi biologica, si osserva un grado progressivo di alterazione nei siti nel seguente ordine (Fig. 4.4b): cluster St. 1, St. 9 e St. 10; St. 2; cluster St. 4, St. 5 e St. 6; cluster St. 3 e St. 7; St. 8. Dall'altra parte, secondo le coordinate medie delle stazioni lungo il primo asse (gradiente di inquinamento) dell'analisi chimica, si nota un ordine progressivo leggermente diverso (Fig. 4.4b): cluster St. 1, St. 2, St. 9 e St. 10; St. 3; cluster St. 4, St. 5 e St. 6; St. 7; St. 8.

Infatti, l'analisi biologica ha messo in luce in maniera migliore il livello di disturbo alla Stazione 2, che è interessata da effluenti derivanti dalla vicina fabbrica di lavorazione del vetro (vetreria), e ancora di più alla Stazione 3, che è interessata da acque di scarico derivanti da insediamenti civili ed industriali. La principale ragione di questa alta sensibilità è che gli effetti fisiologici e comportamentali della comunità dei macroinvertebrati dipendono dalla particolare miscela qualitativa degli inquinanti presenti nei diversi microhabitat in relazione ai cicli biologici dei taxa (Verberk et al., 2008; Dolédec e Statzner, 2010; Walters, 2011).

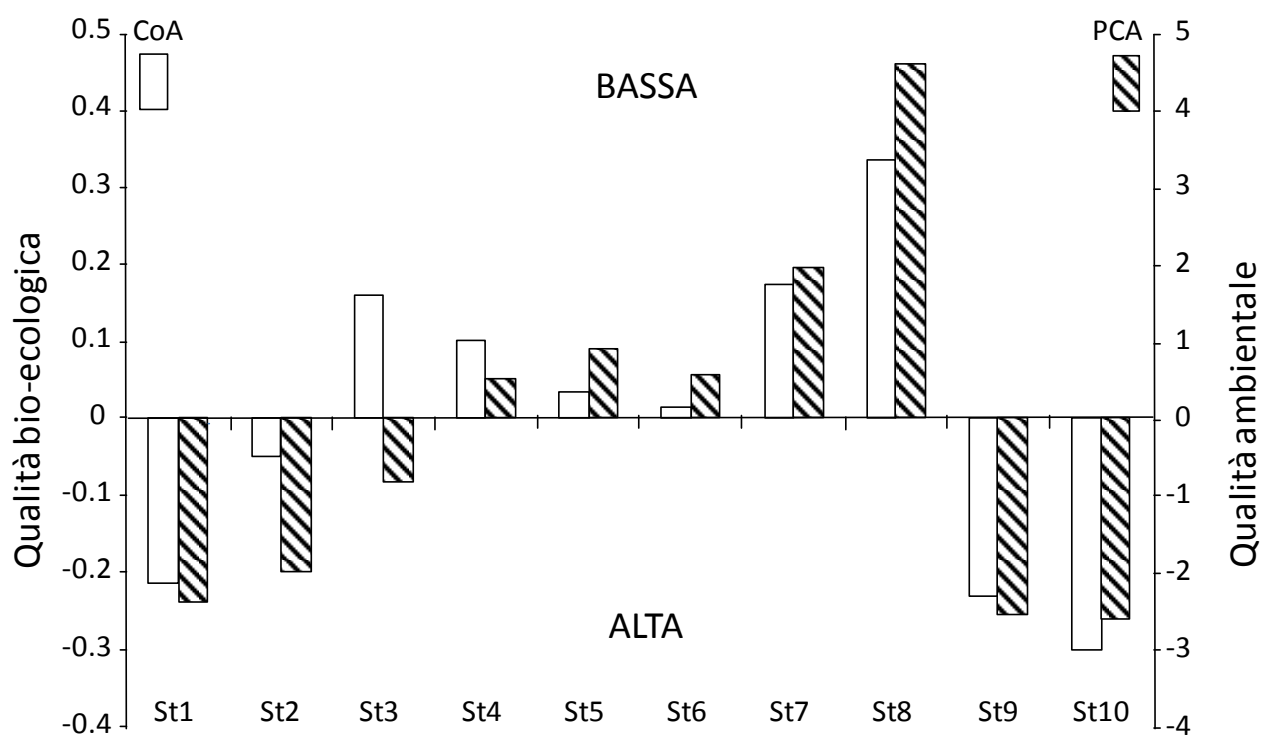
D'altronde, l'approccio basato sull'analisi dei dati chimici è più efficace nel descrivere la variabilità delle stazioni molto inquinate, dove la variabilità dei tratti funzionali è fortemente ridotta e quindi scarsamente informativa (vedi St. 8).



(a)



(b)



**Figura 4.4** - Coordinate medie (mesi e stazioni) dei primi due assi dell'Analisi di Co-inerzia (CoA) e dell'Analisi delle Componenti Principali (PCA): **(a)** coordinate medie dei mesi lungo il secondo asse della CoA e della PCA; **(b)** coordinate medie delle stazioni lungo il primo asse della CoA e della PCA.

## **4.5 CONCLUSIONI**

L'obiettivo principale del presente studio è stato quello di comparare, e se possibile di armonizzare, due differenti approcci per la caratterizzazione dello stato ambientale di un bacino fluviale, ossia, da una parte l'analisi delle variabili chimiche e dall'altra quella dei tratti funzionali dei macroinvertebrati.

I risultati dello studio, che si è basato su una campagna di monitoraggio stagionale del bacino del Fiume Nestore, hanno indicato che i tratti biologici ed ecologici svolgono un ruolo rilevante nella biovalutazione di un ecosistema lotico stressato, e che tali tratti possono essere usati per determinare il livello di disturbo antropico in condizioni di inquinamento che vanno da lievi a moderate. Questa informazione può essere completata con le analisi basate su dati chimici, che possono descrivere in maniera migliore i casi caratterizzati da un elevato inquinamento. L'approccio integrato è particolarmente utile in situazioni nelle quali la concentrazione degli inquinanti mostra un alto grado di variabilità, come nel caso qui esaminato.



# 5

## IMPATTO DEI METALLI PESANTI SULLE COMUNITÀ DI MACROINVERTEBRATI NEL SISTEMA IDROGRAFICO

In questo lavoro si propone l'uso delle *Self-Organizing Map* (SOM, reti neurali) per illustrare i modelli di diversità dei macroinvertebrati fluviali e l'inquinamento delle acque in modo facilmente interpretabile. Sono state campionate 14 stazioni, in varie stagioni, nel bacino del Fiume Nestore (Italia Centrale) e sono state caratterizzate per quanto riguarda le comunità di macroinvertebrati e le concentrazioni di nutrienti e metalli pesanti. L'algoritmo delle SOM, combinando le funzioni di ordinazione, clustering e analisi dei gradienti, descrive in modo soddisfacente i cambiamenti qualitativi e quantitativi osservati nelle comunità di macroinvertebrati nello spazio e nel tempo, e i cambiamenti in termini di tratti biologici in relazione ai disturbi antropici. I modelli spaziali e stagionali delle comunità sono stati messi in relazione alla qualità ambientale e all'uso del territorio (attività economiche) del bacino del Fiume Nestore, introducendo le variabili chimiche, fisico-chimiche e i metalli pesanti nella SOM, precedentemente addestrata con i dati relativi ai macroinvertebrati. Sebbene l'approccio proposto non permetta di stabilire l'effetto specifico dei diversi fattori di stress nei confronti della composizione della comunità di macroinvertebrati sulla base di uno studio di campo, esso costituisce una tecnica a basso costo per la valutazione della salute di un corso d'acqua basata su gruppi di indicatori ecologici.

## IMPACT DE MÉTAUX LOURDS SUR LA DIVERSITÉ DES COMMUNAUTÉS BENTHIQUES À L'ÉCHELLE DU RÉSEAU HYDROGRAPHIQUE

Nous avons utilisé les cartes auto-organisatrices de Kohonen (Self-Organizing Maps, SOM) pour modéliser l'impact de la pollution aux métaux lourds sur les communautés d'invertébrés benthiques à l'échelle du réseau hydrographique du Nestore. Nous avons échantillonné 14 stations aux quatre saisons de l'année, caractérisées par leurs communautés (composition taxonomique, abondance), les concentrations en ions et cations, et les métaux lourds. Les SOMs, qui combinent les fonctions d'ordination, de clustering et d'analyse de gradients, ont permis d'illustrer les variations spatio-temporelles de la diversité benthique en relation avec la qualité physico-chimique des stations, et plus particulièrement les activités économiques au sein du bassin versant. Un premier cluster (A) de stations correspond à la période estivale dans les têtes de bassin, où la qualité biologique est excellente. Un second cluster (C) caractérise les sites les plus pollués quelle que soit la période de l'année (fortes concentrations en ammonium et phosphate, cadmium, plomb). Un cluster intermédiaire (B) montre des sites de qualité biologique moyenne. La diversité taxonomique et structurelle (entropie, équitabilité) décroissent des clusters A à C, notamment du fait de la disparition progressive d'insectes polluosensibles (Trichoptères) tandis que des invertébrés polluosensibles deviennent dominants (annélides tubificidés et hirudinés). Les variations saisonnières dans l'appartenance des stations aux clusters (notamment cluster B) semblent corrélées à la saisonnalité des activités humaines, notamment aux pratiques agricoles. La visualisation directe des gradients environnementaux et de diversité biologique dans l'espace et dans le temps confère aux SOM un intérêt pour une évaluation rapide des états écologiques au sein d'un bassin versant.



## 5.1 INTRODUZIONE

Gli ecosistemi d'acqua dolce di tutto il mondo fanno fronte ad un *range* di pressioni antropogeniche che include inquinamento, alterazioni del regime idrologico, pesca eccessiva, distruzione degli habitat ed invasioni biologiche. In particolare, molte regioni pianeggianti concentrano le attività agricole e/o industriali, influenzando in maniera negativa la diversità biologica nei corsi d'acqua (Compin e Céréghino, 2007). Importanti sorgenti di inquinamento derivato dalle attività agricole, sono rappresentate dall'afflusso di nutrienti, pesticidi e metalli pesanti (Kreuger, 1998; Novotny, 1999; Schipper et al., 2008). Le attività industriali possono fungere da sorgente di una varietà di altre sostanze xenobiotiche che, attraverso dilavamento e/o precipitazione, finiscono nei corpi idrici (Holt, 2000). Poiché i sedimenti fluviali hanno una forte capacità di assorbire gli inquinanti (Cairns et al., 1984; Chapman, 1990; Estebe et al., 1997), la contaminazione è spesso maggiore in questi rispetto alla colonna d'acqua (Chapman, 1989). Inoltre, i sedimenti si possono comportare come serbatoi di metalli pesanti, che vengono poi rilasciati nella colonna d'acqua e/o accumulati nei tessuti di animali e piante, entrando così nella catena trofica (Gibbs, 1977; Jain e Sharma, 2001; Filgueiras et al., 2002; Davutluoglu et al., 2011). Le conseguenze delle elevate concentrazioni di nutrienti sulla diversità delle acque dolci sono ben conosciute (Dodson et al., 2000), ma gli effetti dei metalli pesanti sulla composizione delle comunità biologiche e sui modelli di abbondanza delle specie sono largamente sotto studiati (Hickey e Clements, 1998; De Jonge et al., 2008; Zhou et al., 2008). Inoltre, mentre i metalli pesanti hanno impatti ovvi su individui e popolazioni (ad esempio malformazioni dell'apparato boccale di insetti acquatici, Di Veroli et al., 2014), i loro effetti a livello di comunità non hanno necessariamente un eco (Liess e Beketov, 2011), complicando così la valutazione dello stato di salute di un ecosistema attraverso sopralluoghi biologici di routine. Quindi, alla luce sia dello sviluppo economico sia degli attuali regimi di politica sulle acque (US Clean Water Act, Europe Water Framework Directive), caratterizzare gli impatti dell'inquinamento da nutrienti e da metalli pesanti sulla salute di un ecosistema, attraverso gli Elementi di Qualità Biologica (BQE: pesci, macroinvertebrati, macrofite acquatiche, diatomee; vedi per esempio European Water Framework Directive 2000/60/EC), è di rilevanza fondamentale per identificare le minacce agli ecosistemi d'acqua dolce, e per la progettazione di piani di gestione su scala locale e regionale.

I macroinvertebrati costituiscono un'importante parte della produzione animale all'interno degli ecosistemi d'acqua dolce, e sono strettamente integrati nella struttura e nella funzione dei loro

habitat (utilizzo della materia organica, ritenzione dei nutrienti, risorsa trofica per anfibi, pesci o uccelli; Oertli, 1993). Essi sono dunque largamente impiegati come indicatori biologici della salute degli ecosistemi (Rosenberg e Resh, 1993; Bonada et al., 2006), si ritiene infatti che le strutture delle comunità di macroinvertebrati varino consistentemente in relazione all'intensità di ogni tipo di disturbo in una data area. Nelle acque correnti, la maggior parte dei taxa sono bentonici e quindi strettamente legati al sedimento; essi sono quindi considerati potenziali bioindicatori della qualità dei sedimenti, in cui si identifica o si suppone che si verifichi l'inquinamento da metalli pesanti (Naimo, 1995; Yu et al., 2001b; Santoro et al., 2009; Archaimbault et al., 2010). L'identificazione degli effetti (combinati) dei diversi tipi di contaminanti sulla struttura della comunità di macroinvertebrati è comunque impegnativa a causa della covarianza spaziale dei differenti fattori fisico-chimici che agiscono indipendentemente sugli schemi di diversità della comunità. Inoltre, i dati ecologici, quali quelli che riguardano i macroinvertebrati e le variabili ambientali variano e co-variano spesso in modo non lineare. Perciò, per illustrare le relazioni tra i gradienti fisico-chimici e i modelli di comunità, dovrebbero essere preferiti teoricamente dei metodi di modellizzazione non lineare (Lek e Guegan, 2000). Per risultare efficaci, gli sforzi della gestione ambientale devono basarsi su schemi espliciti di distribuzione degli indicatori di qualità ambientale, siano essi biotici e/o abiotici. In altre parole, c'è una necessità di promuovere gli strumenti analitici che "mappano" gli schemi degli indicatori fisico-chimici e biologici di qualità in una maniera facilmente interpretabile.

Lo scopo dello studio è quello di valutare l'influenza di un set di parametri riguardanti la chimica delle acque e i metalli pesanti, sulla composizione della comunità e sugli schemi di abbondanza dei macroinvertebrati a livello di bacino fluviale, utilizzando le Reti Neurali Artificiali (Artificial Neural Network, ANN). Le reti neurali sono state impiegate con successo in vari aspetti della modellizzazione ecologica, come ad esempio per la classificazione di gruppi, per la schematizzazione di relazioni complesse, per la predizione dello sviluppo di popolazioni e comunità, per la modellizzazione dell'idoneità degli habitat e per la valutazione della qualità dell'acqua (Kaltch et al., 2008). Combinando le abilità di clustering e di ordinamento, l'algoritmo della *Self-Organizing Map* (SOM, ANN non supervisionata, Kohonen, 1991) ha mostrato particolare rilevanza nel mettere in luce gli schemi delle comunità biologiche in relazione ai dati ambientali, poiché il gradiente di distribuzione di alcune variabili ambientali (in questo caso metalli pesanti e chimica delle acque) può essere visualizzato in una SOM precedentemente addestrata con le variabili biologiche (Park et al., 2003; Céréghino e Park, 2009).

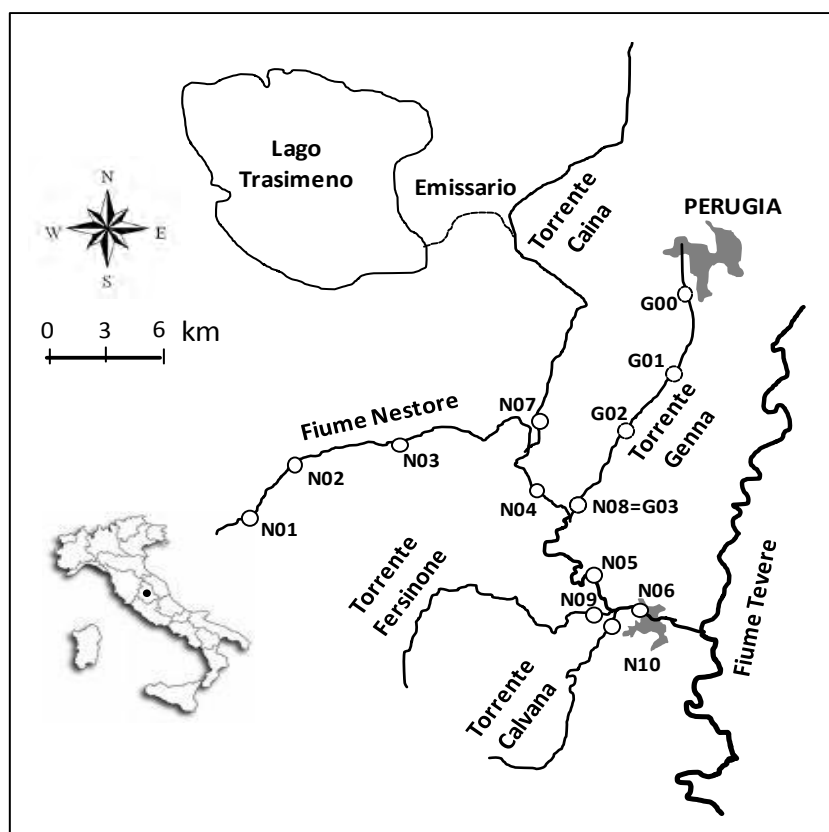
Qui, come caso studio, sono state impiegate le SOM per esaminare la risposta delle comunità di macroinvertebrati alla contaminazione chimica (nutrienti) e da metalli pesanti nello spazio e nel tempo nel bacino del Fiume Nestore (Italia Centrale). Questo bacino fluviale fornisce un contesto adatto per affrontare tali problematiche, in quanto è interessato da numerose fonti di inquinamento risultanti dall'urbanizzazione, dall'industria, dall'agricoltura e dall'allevamento zootecnico intensivo. Inoltre, i sistemi di depurazione dei reflui nell'area sono inefficienti o addirittura assenti. Sono stati effettuati dei campionamenti in un *range* di siti da non alterati a contaminati, in varie stagioni, ed è stata utilizzata la SOM per: (i) mettere in relazione la diversità della comunità con i gradienti di inquinamento, e (ii) mettere in mostra schemi congruenti o divergenti tra particolari inquinanti chimici e/o metalli pesanti.



## 5.2 MATERIALI E METODI

### *Area di studio*

Questo studio è stato condotto nel bacino del Fiume Nestore, Umbria, Italia Centrale (Fig. 5.1). L'area del bacino è di 1116 km<sup>2</sup>, e la lunghezza del corso d'acqua principale è di 48 km (Mearelli et al., 1996). Il Fiume Nestore è un affluente di destra del Fiume Tevere. Nasce da sorgenti multiple e localizzate ubicate nella parte sud-occidentale dell'Umbria (Lorenzoni et al., 2004). L'economia all'interno del bacino consiste sia di attività industriali ed agricole sia di allevamenti zootecnici. I principali affluenti di sinistra del Fiume Nestore sono i torrenti Genna (23 km) e Caina (31 km) (rispettivamente parte centro-orientale e settentrionale del bacino). Questi torrenti drenano aree urbanizzate, con attività industriali, agricole e zootecniche. I principali affluenti di destra sono i torrenti Fersinone (25 km) e Calvana (18 km) (parte sud-occidentale del bacino), che scorrono attraverso aree scarsamente popolate. Sia il fiume Nestore che i suoi affluenti sono caratterizzati da un regime idraulico variabile (ARPA Umbria, 2010).



**Figura 5.1** - Cartina dell'area di studio e localizzazione delle stazioni di campionamento (G: 00 - 03; N: 01 - 10).

*Campagna di campionamento*

Il piano di campionamento è stato realizzato con due differenti indagini, una riguardante l'intero bacino del Fiume Nestore (N), ed una seconda riguardante il Torrente Genna (G, affluente di sinistra) (Fig. 5.1). La prima indagine (N) è stata effettuata tra Marzo ed Ottobre 2010 ed era composta da quattro campionamenti stagionali (Marzo, Giugno, Agosto ed Ottobre). Sono state selezionate dieci stazioni, sei lungo il Fiume Nestore (N01 - 06) e quattro nei suoi principali affluenti, appena prima della loro confluenza con il Fiume Nestore (N07 = Torrente Caina; N08 = Torrente Genna; N09 = Torrente Fersinone; N10 = Torrente Calvana). La seconda indagine (G) è stata effettuata tra Marzo ed Ottobre 2012 e constava di tre campionamenti stagionali (Marzo, Giugno ed Ottobre). Sono state individuate quattro stazioni di campionamento lungo il Torrente Genna (G00 - G03; G03 = N08). Le stazioni N09 e N10 della prima indagine non sono state campionate ad Ottobre, e ad Agosto ed Ottobre, rispettivamente, perché i torrenti erano in secca. Per la stessa ragione, la stazione G00 della seconda indagine non è stata campionata a Marzo ed Ottobre. Le principali caratteristiche delle stazioni di campionamento sono elencate in Tabella 5.1. In ogni stazione, i campioni di macroinvertebrati sono stati raccolti con un retino immanicato equipaggiato con una rete con maglie da 335 $\mu$ m. Il tempo di campionamento standardizzato era di 10 minuti, da sponda a sponda, prendendo in considerazione tutti i microhabitat presenti (Ghetti e Bonazzi, 1981). I campioni sono stati fissati in alcol al 70%. In laboratorio, i macroinvertebrati sono stati identificati a livello di specie, genere o famiglia, attraverso l'utilizzo di diverse chiavi tassonomiche (Tachet et al., 2006; Moretti, 1983; Carchini, 1983; Campaioli et al., 1999; Consiglio, 1980; Belfiore, 1983; Sansoni, 1998), e contati.

Sono stati misurati i principali parametri chimico-fisici delle acque e sono stati raccolti campioni di acqua e sedimento.

**Tabella 5.1** - Caratteristiche delle stazioni di campionamento. Altitudine: m s.l.m., larghezza: m, profondità media: m.

Codice	Corso d'acqua	Altitudine	Larghezza	Profondità media
N01	Nestore	303	3	0,15
N02	Nestore	263	7	0,50
N03	Nestore	232	6	0,20
N04	Nestore	203	13	0,25
N05	Nestore	182	15	0,55
N06	Nestore	174	21	0,50
N07	Caina	215	8	0,20
N08 = G03	Genna	199	7	0,35
N09	Fersinone	179	11	0,30
N10	Calvana	185	11	0,20
G00	Genna	243	4	0,15
G01	Genna	225	5	0,35
G02	Genna	209	5	0,25
N08 = G03	Genna	199	7	0,35

#### *Caratterizzazione chimica e chimico-fisica delle acque superficiali*

I seguenti parametri chimico-fisici delle acque sono stati misurati *in situ*: temperatura, ossigeno disciolto (DO; Ossimetro F-Simplair Syland Scientific, precisione 1% del valore di scala, campo di misura: 0,0 - 20,0 O<sub>2</sub> mg L<sup>-1</sup>), pH (pHmetro Hanna Instruments HI-98150, scala: -4,00 - 19,99, risoluzione 0,01 pH, precisione  $\pm 0,02$  pH) e conducibilità (HI8733-Hanna Instruments, scala: 0 - 1999  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , precisione 1%, risoluzione 1  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ).

Sono stati raccolti campioni di acqua in bottiglie di polietilene da 500 mL e conservati in frigorifero a 5 °C per la successiva caratterizzazione anionica e cationica e per la determinazione del Chemical Oxygen Demand (COD). La determinazione del COD è stata effettuata attraverso metodo colorimetrico (Colorimetro Smart 2 La Motte Company, COD Low Range Reagent Kit, 0-150 mg L<sup>-1</sup> COD, limite di rilevamento 0,5 mg L<sup>-1</sup>). Le concentrazioni delle specie di anioni e cationi (anioni= F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>, SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>; cationi= Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup>) sono state determinate attraverso Cromatografia Ionica Soppressa con detector a conducibilità utilizzando un cromatografo Dionex Series 4500i. Sono state utilizzate soluzioni standard (Fluka-TraceCERT® Standard Solutions, 1000 mg L<sup>-1</sup>  $\pm$  4 mg L<sup>-1</sup>) in acqua ultrapura (18,2 M $\Omega$  at 25 °C) per preparare opportuni standard di calibrazione. Le analisi sono state effettuate previa filtrazione dei campioni con filtri di cellulosa (0,2  $\mu\text{m}$ ) (Selvaggi et al., 2010).

*Determinazione dei metalli pesanti nei sedimenti*

La concentrazione dei metalli pesanti (Cr, Cd, Cu, Ni, Zn, Pb) per i campioni del 2010 del Bacino del Fiume Nestore, è stata determinata mediante Spettrometria ad Assorbimento Atomico in fiamma (Perkin–Elmer 3300, limite strumentale di rilevazione 0,01 - 0,20 mg L<sup>-1</sup>). Sono state utilizzate soluzioni standard (Fluka-TraceCERT®, 1000 mg L<sup>-1</sup> ± 4 mgL<sup>-1</sup>) in acido nitrico al 2% per preparare appropriati standard di calibrazione.

La concentrazione dei metalli pesanti (Cr, Cd, Cu, Ni, Zn, Pb) per i campioni del 2012 del Bacino del Fiume Nestore sono stati determinati mediante Spettroscopia di Emissione Ottica con Plasma Accoppiato Induttivamente (ICP-OES Ultima2, HORIBA Scientific, limite strumentale di rilevazione: 0,14 - 1,58 µg L<sup>-1</sup>) equipaggiato con un nebulizzatore ad ultrasuoni (CETAC Technologies, U-5000AT). Sono state utilizzate soluzioni standard (ICP multi-element standard solution IV CertiPUR®, VWR Merck Chemicals and Reagents, 1000 mg L<sup>-1</sup>) in acido nitrico per preparare appropriati standard di calibrazione.

Tutte le misurazioni dei metalli pesanti nei sedimenti sono basate su due repliche.

I campioni di sedimento sono stati ottenuti dragando lo strato superficiale (ca. 5 cm) dei sedimenti del fondale con una draga manuale. I campioni (500 g) sono stati conservati in bottiglie di polietilene e congelati a -18 °C (MATT e APAT, 2005).

Tutti i campioni di sedimento sono stati essiccati all'aria, disaggregati usando mortaio e pestello e fatti passare attraverso un setaccio con maglie di 2 mm, essiccati a 105 °C per 24h e digeriti come segue: sono stati aggiunti al campione (2,0 g) 15 mL di acido nitrico ultrapuro concentrato (Fluka, TraceSELECT®, per l'analisi di tracce ≥ 69%) e la miscela è stata riscaldata a 160 °C per 1h; poi, il recipiente è stato raffreddato a temperatura ambiente e sono stati aggiunti 10 mL di acido cloridrico ultrapuro concentrato (Fluka, TraceSELECT®, per l'analisi di tracce ≥ 37%) e il recipiente è stato riscaldato a 160 °C per 1h. La miscela è stata raffreddata, filtrata (filtri Whatman Grade No. 42, porosità 2,5 µm) e diluita con acqua ultrapura a 50 mL.

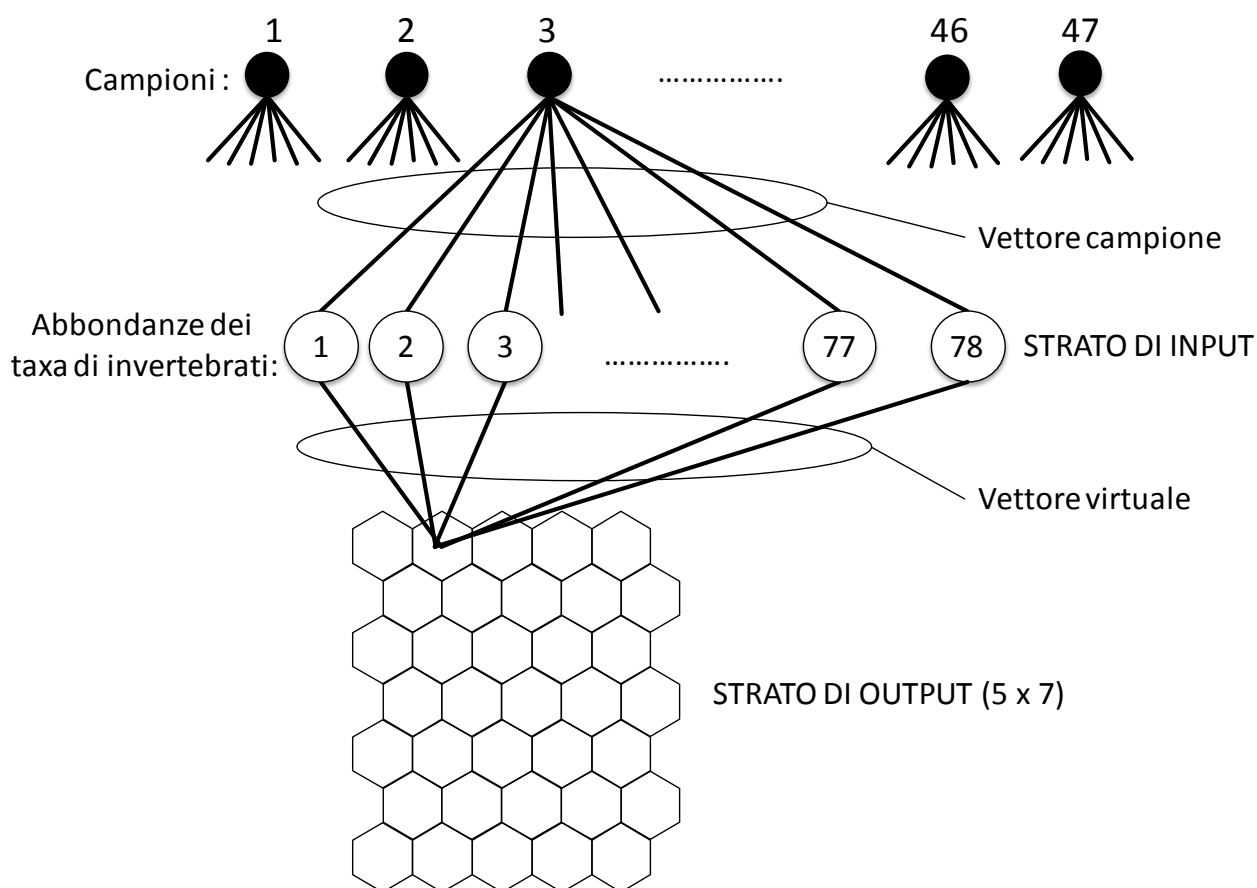
*Procedura di modellizzazione*

Per ordinare i 47 campioni (indagine 2010 (N): 37 campionamenti stagionali in 10 stazioni; indagine 2012 (G): 10 campionamenti stagionali in 4 stazioni), è stato utilizzato l'algoritmo delle SOM (SOM Toolbox version 2 for Matlab®, vedi Vesanto et al. (1999) per istruzioni pratiche). I punti di forza delle SOM nei confronti delle analisi multivariate convenzionali sono stati discussi in Giraudel e Lek, (2001). Combinando le funzioni di ordinazione e di analisi dei gradienti, le SOM

sono convenienti per visualizzare i dati ad alta dimensione in una maniera facilmente interpretabile senza una trasformazione precedente. L'algoritmo delle SOM è una procedura di apprendimento non supervisionata che trasforma i dati multi-dimensionali di input in una mappa bi-dimensionale soggetta ad un vincolo topologico (*neighborhood preserving*) (dettagliato in Kohonen, 2001). La SOM traccia quindi le somiglianze tra i dati, raggruppando gli elementi di dati simili insieme in uno spazio 2D (visualizzato come una griglia), utilizzando un processo di apprendimento iterativo che è stato dettagliato in Park et al. (2003). L'algoritmo delle SOM è specificatamente rilevante per analizzare set di variabili che variano e co-variano in maniera non lineare e/o che hanno una distribuzione asimmetrica. Inoltre, l'algoritmo delle SOM media il *dataset* di *input* utilizzando dei vettori peso attraverso il processo di apprendimento, rimuovendo così il rumore. Una descrizione completa della procedura di modellizzazione impiegata in questo studio (apprendimento, selezione della taglia della mappa, numero di iterazioni, similarità misurata in termini di distanza euclidea, misurazioni della qualità della mappa) è dettagliata in Park et al. (2003) e in Céréghino e Park (2009). La struttura della SOM per quest'analisi era costituita da due strati di neuroni connessi dai pesi (o intensità di connessione): lo strato di *input* era composto da 78 neuroni (uno per taxon di macroinvertebrato) connessi con i 47 campioni, e lo strato di *output* era composto da 35 neuroni visualizzati come celle esagonali organizzate in una matrice con 7 righe e 5 colonne (Fig. 5.2). Il numero di 35 neuroni di *output* è stato ritenuto valido in seguito al calcolo degli errori di quantizzazione e topografico (vedi Céréghino e Park, 2009), e corrispondeva in maniera esatta con la regola euristica di Vesanto et al. (2000) che riporta che il numero ottimale di neuroni di output è vicino a  $C = 5\sqrt{n}$ , in cui  $n$  = numero dei campioni. Alla fine dell'apprendimento, ogni campione è collocato all'interno di un esagono della mappa della SOM. I campioni che appaiono distanti nello spazio di modellizzazione (a seconda dei dati di abbondanza dei macroinvertebrati utilizzati durante l'apprendimento) rappresentano differenze chimiche attese per caratteristiche ambientali reali. Un algoritmo *k-means* è stato applicato per il clustering della mappa addestrata (Ultsch, 1993). Le unità della SOM (esagoni) sono state divise in cluster a seconda dei vettori peso dei neuroni, e il numero dei cluster è stato giustificato dall'Indice di Davis Bouldin più basso, vale a dire per una soluzione con bassa varianza all'interno dei cluster e alta varianza tra i cluster (Céréghino et al., 2003). Al fine di analizzare il contributo di ciascun taxon di macroinvertebrato alle strutture di cluster della SOM addestrata, ogni variabile di input, calcolata durante il processo di apprendimento, viene visualizzata in ogni neurone (esagono) della SOM

addestrata, in scala di grigi. Questo metodo di visualizzazione descrive direttamente il potere di discriminazione delle variabili di input nel mappaggio (Kohonen, 2001).

Infine, per mettere in evidenza le relazioni tra le variabili abiotiche e biotiche, sono state introdotte le 23 variabili chimiche, fisico-chimiche e i metalli pesanti nella SOM precedentemente addestrata con i dati sull'abbondanza dei 78 taxa di macroinvertebrati. Durante l'apprendimento, è stata utilizzata una funzione maschera per assegnare un peso nullo alle 23 variabili chimiche, fisico-chimiche e di metalli pesanti, mentre a quelle biologiche era assegnato un peso di 1, cosicché il processo di ordinazione era basato solo sui 78 taxa di macroinvertebrati (Compin e Céréghino, 2007). Impostare il valore maschera a 0 per una certa componente, rimuove l'effetto di quella componente sull'organizzazione (Sirola et al., 2004).

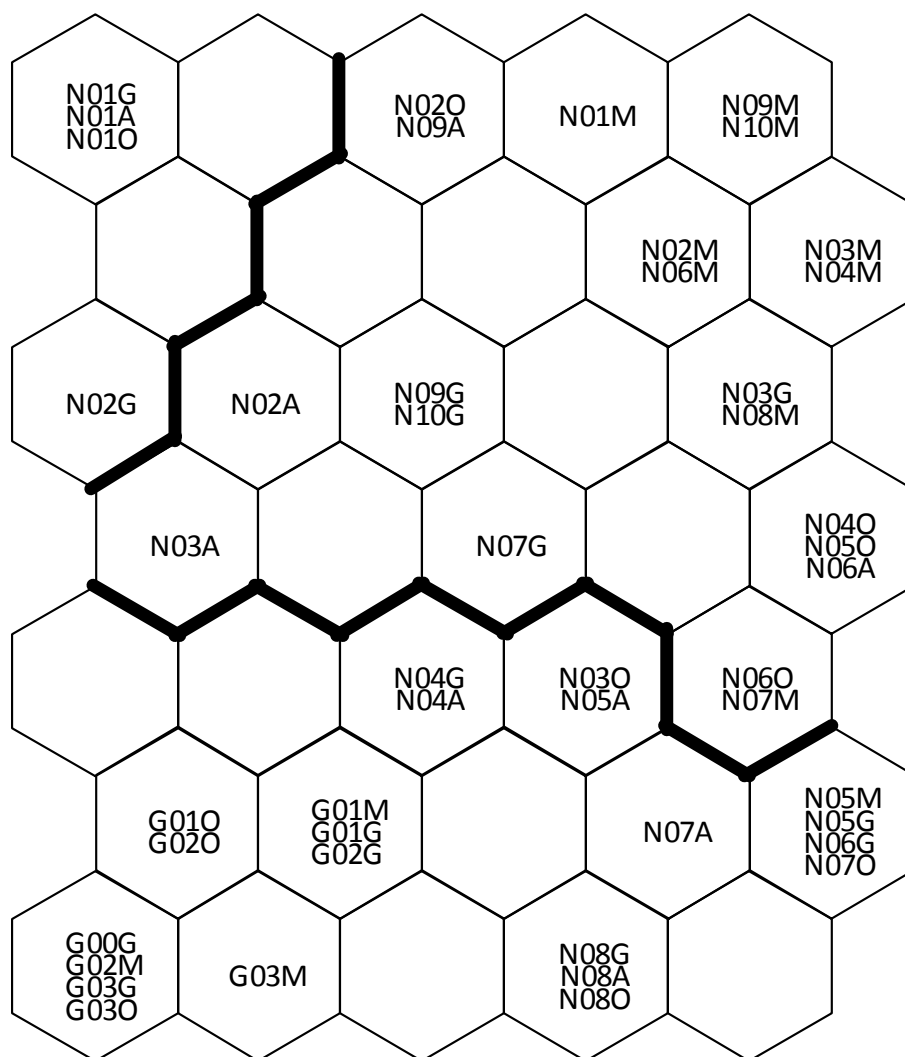


**Figura 5.2** - La struttura della *Self-Organizing Map* (SOM). Lo strato di *input* è connesso con le celle dello strato di *output* da dei pesi che definiscono la comunità di invertebrati virtuale. I campioni (siti per stagioni) del *dataset* sono presentati in modo casuale in input. Il vettore campione, composto da tanti elementi quanti sono i descrittori, è comparato con il vettore virtuale associato ad ogni neurone dell'output utilizzando una misura di distanza.

Per evidenziare ulteriormente la comunità di macroinvertebrati e i modelli ambientali tra i cluster, sono stati comparati tra i diversi cluster attraverso l'utilizzo di Mann-Whitney test: le distribuzioni della ricchezza tassonomica, il numero degli individui, l'uniformità della comunità (Indice di Simpson) (Simpson 1949), l'entropia della comunità (Indice di Shannon) (Shannon, 1948), l'indice di Chao (Chao, 1984, Colwell e Coddington, 1994) e le variabili fisico-chimiche e i metalli pesanti. Questi test statistici sono stati effettuati utilizzando il software Past (versione 3.02) (Hammer et al., 2001).

### 5.3 RISULTATI

Dopo il processo di apprendimento della SOM con i dati sull'abbondanza dei macroinvertebrati, i 47 campioni sono stati classificati in tre sottogruppi (cluster A - C) in base alla struttura quantitativa dei loro assemblaggi di macroinvertebrati (Fig. 5.3).



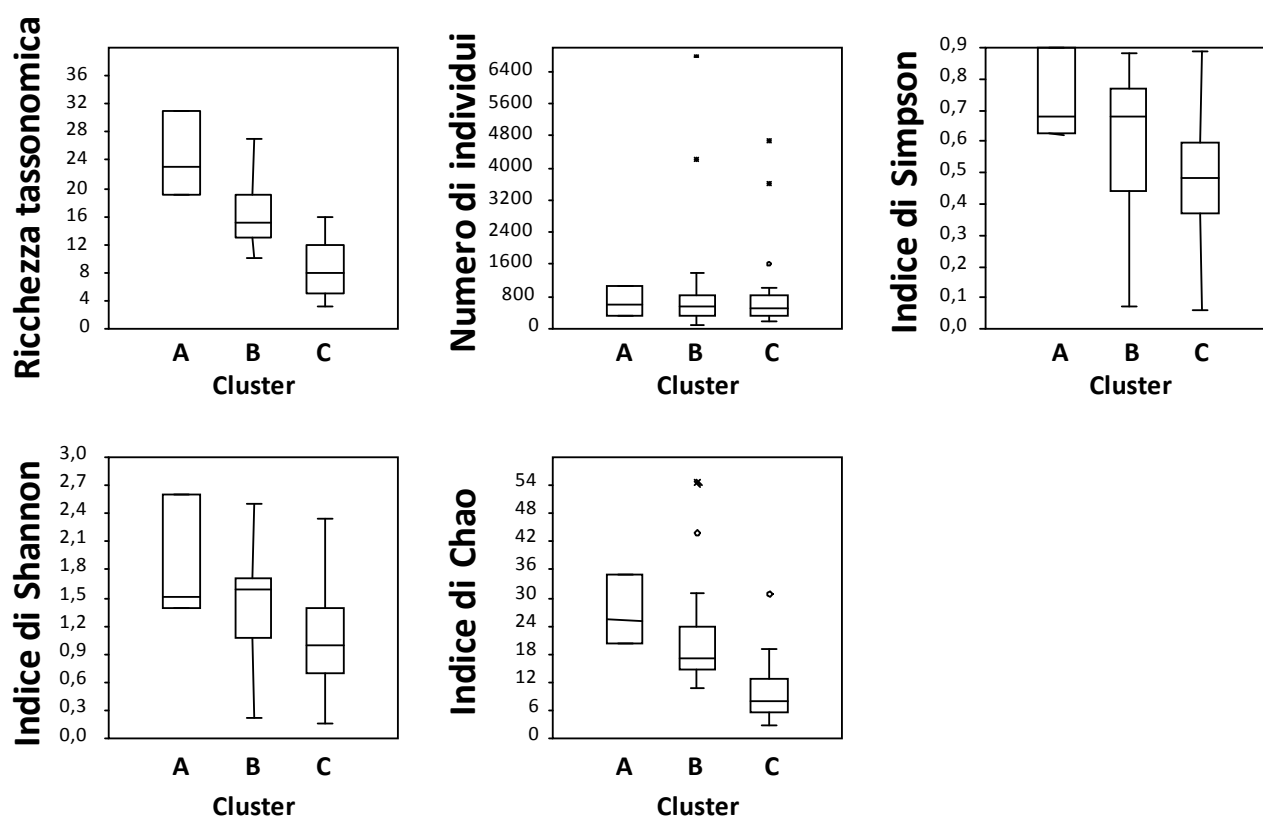
**Figura 5.3** - Distribuzione e *clustering* dei campioni sulla *Self-Organizing Map* (SOM) in base all'abbondanza dei 78 taxa di macroinvertebrati. I codici all'interno di ogni esagono (ad esempio, N01M, G03G) corrispondono a campioni individuali (vedi anche Tab. 5.1): N (indagine Nestore, 2010), G (indagine Genna, 2012), 00 - 10 stazioni di campionamento, M = Marzo, G = Giugno, A = Agosto, O = Ottobre. I cluster A - C (separati dalle linee in grassetto) sono stati ottenuti dall'algoritmo *k-means* applicato ai pesi dei 78 taxa nei 35 neuroni di output della SOM.

Il *clustering* della SOM ha rivelato variazioni sia spaziali che stagionali nella struttura della comunità di macroinvertebrati. Il cluster A raggruppava 4 campioni delle stazioni N01 - N02, quelle più a monte. Il cluster B raggruppava tutti i campioni delle stazioni N09 - N10 (affluenti di destra del Fiume Nestore), e quasi tutti i campioni primaverili (Marzo) delle stazioni N01 - N08. Il cluster C raggruppava tutti i campioni stagionali del Torrente Genna (ad eccezione della stazione N08 a



Marzo) e quasi tutti i campioni estivi e autunnali delle stazioni N03 - N07.

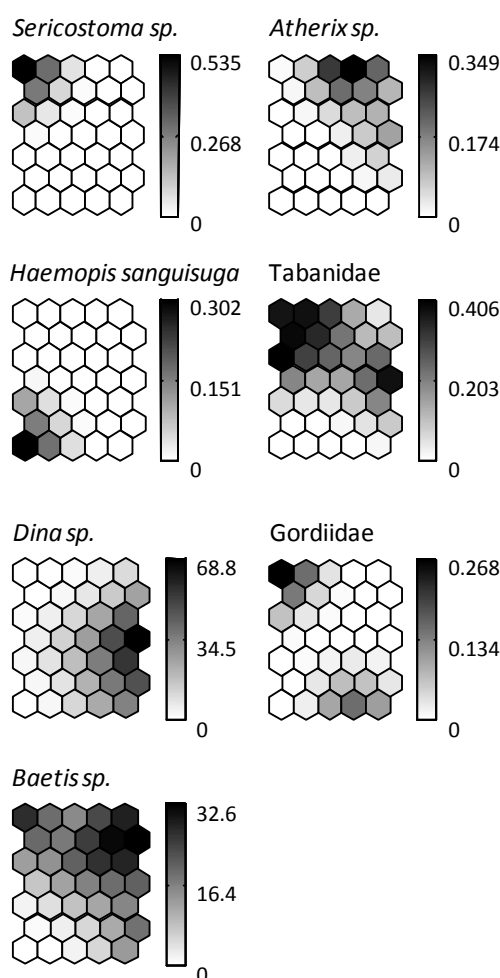
I box-plot mostravano un trend di decremento della diversità della comunità dal cluster A al cluster C (Fig. 5.4). Nello specifico, la ricchezza tassonomica e l'indice di Chao differivano significativamente tra tutti i tre cluster (Mann-Whitney test,  $P < 0.05$ ), l'uniformità di Simpson differiva tra i cluster A e C, e l'entropia di Shannon era significativamente differente tra il cluster C e gli altri cluster (Tab. 5.2). Infine, non c'era nessuna differenza significativa tra i cluster in termini di numero di individui.



**Figura 5.4** - I boxplot delle distribuzioni degli indici di diversità (ricchezza tassonomica, numero di individui, indici di Simpson, Shannon e Chao) per i tre cluster, con confronti tra coppie di cluster.

Quando è stata visualizzata la distribuzione dei singoli taxon di macroinvertebrati nella SOM addestrata utilizzando una scala di grigi (alcuni esempi in Figura 5.5), è risultato evidente che il cluster A possedeva 8 taxa che non erano presenti invece negli altri cluster (*Deronectes moestus*, *Elmis*, *Gyrinus*, *Halesus*, *Haliphus*, *Helophorus*, *Mystacides azurea*, *Sericostoma*); il cluster B possedeva 10 taxa specifici (*Atherix*, *Choroterpes picteti*, *Gyraulus*, *Muscidae*, *Nemoura*, *Paraleptophlebia*, *Pisidium*, *Potamon fluviatile*, *Potamopyrgus*, *Siphonoperla torrentium*), e il cluster C possedeva 4 taxa che non erano presenti negli altri cluster (*Culicinae*, *Haemopsis sanguisuga*, *Procambarus clarkii*, *Trocheta*). Questi taxa contribuivano quindi in maniera

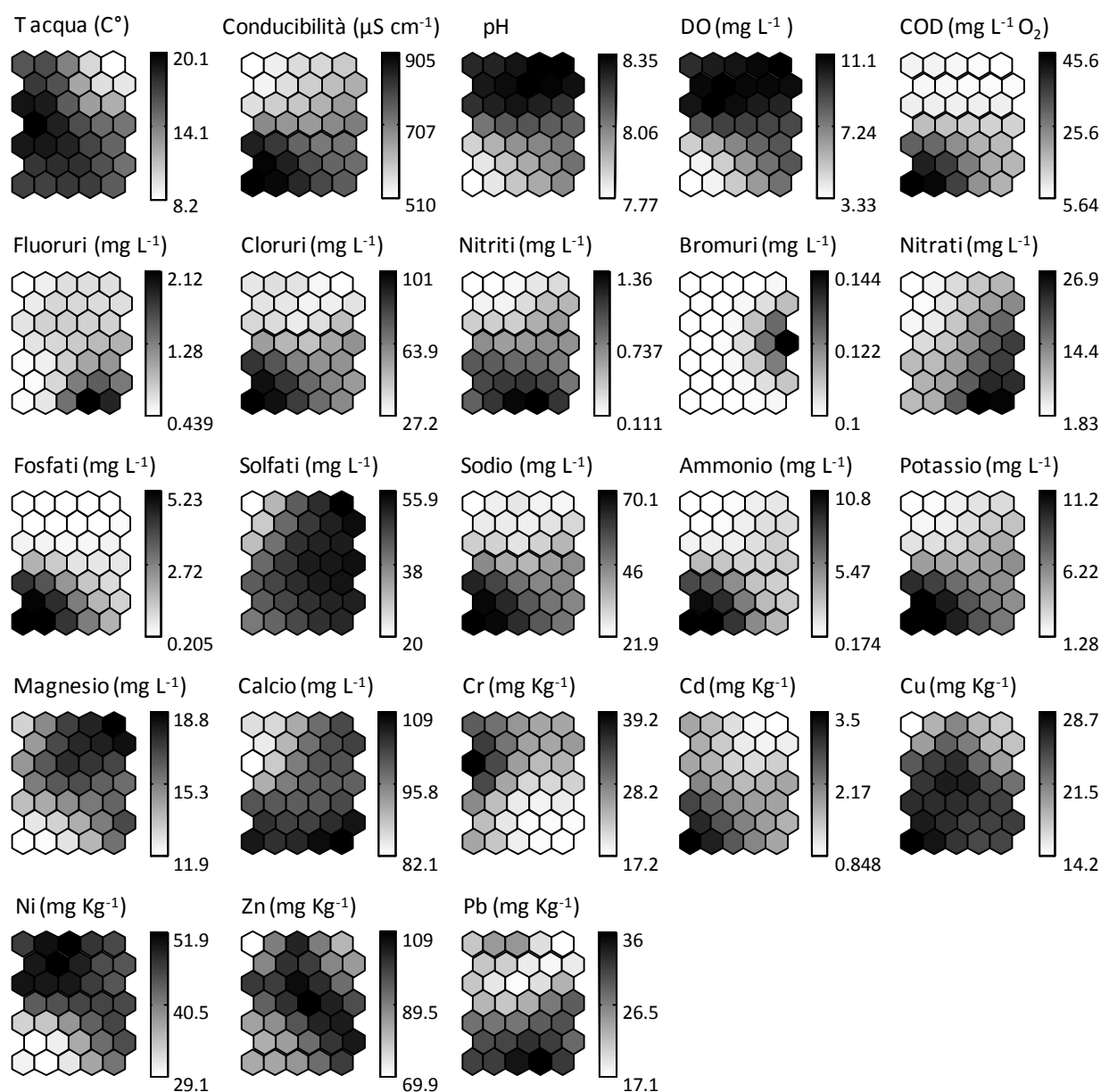
consistente al delineamento dei tre cluster, e possono essere considerati come indicatori delle condizioni ambientali associate ai campioni corrispondenti.



**Figura 5.5** - Analisi del gradiente di abbondanza (numero di individui) per alcuni taxa selezionati (esclusivi dei diversi cluster: *Sericostoma*, cluster A; *Atherix*, cluster B; *Haemopsis sanguisuga*, cluster C; e condivisi tra i cluster: Tabanidae, cluster A e B, *Dina*, cluster B e C; Gordiidae, cluster A e C; *Baetis*, cluster A, B e C) sulla SOM addestrata sono rappresentati da una scala di grigi (scuro = alta abbondanza, chiaro = bassa abbondanza).

Quando le variabili chimiche, fisico-chimiche e i metalli pesanti sono stati introdotti nella SOM precedentemente addestrata con i dati riguardanti i macroinvertebrati, formando così variabili esplicative (Fig. 5.6), in particolare nell'ordinata della SOM si evidenziava un gradiente di pH e DO, da bassi valori (parte inferiore della mappa) ad alti valori (parte alta della mappa), e un gradiente inverso di Pb e  $\text{NO}_2^-$ . I valori di  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ , Cd, Cu, COD e conducibilità aumentavano dalla parte in alto a destra della mappa verso la parte in basso a sinistra, e si evidenziava un gradiente di Cr dall'area in basso a destra verso l'area in alto a sinistra. Sono stati anche notati gradienti di  $\text{F}^-$  and  $\text{NO}_3^-$  dalla parte in alto a sinistra alla parte in basso a destra della SOM. I cluster A e B si caratterizzavano per alti valori di pH e DO, e il cluster C si caratterizzava invece per alti

valori di  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ , Cd, Cu, Pb, COD e conducibilità. Solo la conducibilità e il  $\text{K}^+$  presentavano una differenza significativa tra tutti i tre cluster (test Mann-Whitney,  $P < 0.05$ ). I valori di pH, DO, COD,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ , Cr e Ni presentavano una differenza significativa tra il cluster C e gli altri cluster.  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$  erano significativamente diversi tra il cluster A e gli altri cluster.  $\text{Mg}^{+2}$  era significativamente diverso tra il cluster B e gli altri cluster. La temperatura dell'acqua e il Cd differivano significativamente tra il cluster B e il cluster C e  $\text{Ca}^{+2}$  differiva significativamente tra il cluster C e il cluster A. Infine,  $\text{F}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{Br}^-$ , Cu, Zn e Pb non presentavano differenze significative tra i cluster (Tab. 5.2).



**Figura 5.6** - Visualizzazione dei parametri chimici e fisico-chimici delle acque e dei metalli pesanti dei sedimenti (scala di grigi). I valori medi di ogni variabile sono stati calcolati in ogni neurone di *output* della SOM precedentemente addestrata con i dati dei macroinvertebrati (scuro = valori alti, chiaro = valori bassi).

**Tabella 5.2** - Differenze significative tra i cluster, saggiate con il test di Mann-Whitney; \* P <0.05, \*\*P<0.01, ns = nessuna differenza significativa.

	Cluster	A	B
Ricchezza tassonomica	B	**	
	C	**	**
Numero di individui	B	ns	
	C	ns	ns
Indice di Simpson	B	ns	
	C	*	ns
Indice di Shannon	B	ns	
	C	*	*
Indice di Chao	B	*	
	C	**	**
Temperatura	B	ns	
	C	ns	*
Conducibilità	B	*	
	C	**	**
pH	B	ns	
	C	*	**
DO	B	ns	
	C	*	**
COD	B	ns	
	C	*	**
F <sup>-</sup>	B	ns	
	C	ns	ns
Cl <sup>-</sup>	B	ns	
	C	*	**
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	B	ns	
	C	ns	ns
Br <sup>-</sup>	B	ns	
	C	ns	ns

	Cluster	A	B
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	B	**	
	C	**	ns
PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	B	ns	
	C	*	**
SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	B	**	
	C	**	ns
Na <sup>+</sup>	B	ns	
	C	**	**
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	B	ns	
	C	**	**
K <sup>+</sup>	B	**	
	C	**	**
Mg <sup>+2</sup>	B	**	
	C	ns	**
Ca <sup>+2</sup>	B	ns	
	C	*	ns
Cr	B	ns	
	C	**	*
Cd	B	ns	
	C	ns	**
Cu	B	ns	
	C	ns	ns
Ni	B	ns	
	C	*	**
Zn	B	ns	
	C	ns	ns
Pb	B	ns	
	C	ns	ns

## 5.4 DISCUSSIONE

La pianificazione della gestione ambientale richiede degli schemi espliciti, come possono esserlo i modelli di distribuzione della diversità biologica in relazione agli attributi geomorfologici, fisici e/o chimici di un ecosistema, per la successiva valutazione della deviazione da uno stato di riferimento, per la definizione degli obiettivi di qualità ed eventualmente per anticipare il rischio ecologico. Tra le domande che vengono rivolte agli esperti scientifici, le più comuni sono probabilmente le seguenti: (1) quali aree all'interno di un sistema regionale sono le più compromesse dalle attività industriali o agricole? e (2) quali sono gli elementi di stress fisici e/o chimici che causano un impatto negativo nella qualità biologica degli ecosistemi interessati? Inoltre, se le minacce associate alle attuali attività e ai futuri piani di sviluppo andassero ad incidere sulle zone di interesse conservazionistico (ad esempio sulla presenza di specie bandiera), questo potrebbe dare nuovo impeto alle politiche di gestione delle acque dolci. Alla luce di queste impostazioni, la visualizzazione della SOM è uno strumento analitico efficiente per mettere in evidenza le relazioni tra le località campione, le variabili biologiche e le variabili ambientali (Céréghino e Park, 2009). Attraverso un processo di apprendimento automatico, la SOM minimizza il problema degli *outlier* (ad esempio, la presenza di valori singoli), ogni *outlier* è infatti assegnato ad un'unità della mappa, e solo il peso di quell'unità e i suoi vicini più stretti ne risentono. Infine, sovrapponendo le mappe delle specie e/o quelle sulle variabili esplicative, ogni sovrapposizione o segregazione nella mappa di *output* risulta chiara e può essere interpretata in una maniera diretta. I cluster della SOM hanno rivelato degli schemi spaziali, e in minor entità stagionali riguardo le comunità di macroinvertebrati, in relazione alla qualità ambientale e all'uso del territorio nel bacino del Fiume Nestore. In sintesi, il cluster A raggruppava alcuni campioni stagionali (principalmente estivi) di alta qualità biologica della parte più a monte del Fiume Nestore. Il cluster C raggruppava i campioni con la più bassa biodiversità, di cui la maggior parte erano appartenenti alle stazioni/stagioni più inquinate del Torrente Genna (cioè, alte concentrazioni di ammonio, fosfati, Cd e Pb, tra gli altri contaminanti), così come alcuni campioni estivi-autunnali delle stazioni più a valle del Fiume Nestore. Il cluster B raggruppava quei campioni del Fiume Nestore con una qualità biologica intermedia ed un'intermedia contaminazione. Di conseguenza, i valori per gli indici di diversità usati più di frequente (ricchezza tassonomica, Indice di Chao, uniformità di Simpson ed entropia di Shannon) mostravano un decremento dal cluster A al cluster C. Tra i vari taxa, Thricoptera e Coleoptera in particolare mostravano un declino dal cluster A al cluster C sia in

termini di numero di taxa che di abbondanza degli individui. Comunque, sulla base della struttura della comunità dei macroinvertebrati, alcune stazioni potevano spostarsi da un cluster ad un altro a seconda della stagione. In modo interessante, le stazioni dell'indagine N, da N03 a N08, tendevano a spostarsi dal cluster B (inquinamento intermedio) al cluster C (inquinamento più marcato) in estate-autunno, sebbene queste stagioni corrispondano teoricamente al rinnovo delle popolazioni attraverso la riproduzione e la schiusa delle uova, e dovrebbero essere quindi periodi ricchi di specie per i macroinvertebrati dei corsi d'acqua (Céréghino e Lavandier, 1998). Ulteriori dati sulle pratiche agricole-industriali sarebbero necessarie per valutare propriamente se i cambiamenti temporali nella biodiversità locale sono collegati alla stagionalità degli invertebrati (modelli di ciclo vitale) o a schemi stagionali dell'inquinamento delle acque (ad esempio, pratiche agricole intensificate in estate, in condizioni di ridotta capacità di autodepurazione, coincidenti con i periodi di minore portata idrica).

Per quanto riguarda i modelli spaziali, l'uso del territorio influenza le caratteristiche chimiche e biologiche degli ecosistemi fluviali (Moore e Palmer, 2005) e la struttura delle comunità lotiche di macroinvertebrati potrebbe conseguentemente essere influenzata dalle attività economiche all'interno dei bacini (Sponseller et al., 2001). In questo caso, l'introduzione di variabili esplicative nella SOM addestrata con i dati sui macroinvertebrati ha fornito ulteriori approfondimenti per la comprensione dei modelli di comunità in relazione alle attività umane. Molti composti chimici e metalli pesanti hanno mostrato degli schemi congruenti, sebbene avessero un peso nullo per quanto riguarda il processo di ordinazione e classificazione (cioè non influenzavano il raggruppamento dei campioni). In particolare, nei cluster A e B, alte concentrazioni di Cr e Ni erano associate con alti valori di pH e DO. I tratti più a monte del Fiume Nestore (stazioni N01 e N02, cluster A) sono gli unici circondati da abitazioni sparse. L'attività economica nell'area è limitata ad una fabbrica di lavorazione del vetro, situata a monte della stazione N02. Le stazioni racchiuse nel cluster B sono circondate sia da paesaggi caratterizzati intensamente coltivati sia da territori urbani/industriali. Il Ni e il Cr potrebbero essere quindi prodotti di scarto dei diversi tipi di industrie. Le stazioni racchiuse nel cluster C mostravano alte concentrazioni di Pb, Cd e Cu abbinate ai gradienti di aumento di conducibilità, COD, nitrati, nitriti, ammonio, fosfati, cloruri, sodio e potassio. Coerentemente, tutte le stazioni del cluster C sono circondate da attività agricole intensive e aziende zootecniche (80 allevamenti presenti nell'area). Valori minori di DO (ossigenazione dell'acqua) per questo cluster (Torrente Genna e parte più a valle del Fiume Nestore) suggeriscono un elevato livello di inquinamento organico. Alte concentrazioni di Cu

possono essere correlate alle attività zootecniche in quanto viene utilizzato negli alimenti per gli animali, e i liquami contaminati sono utilizzati in agricoltura come fertilizzanti dei suoli (Mantovi e Bonazzi, 2004). Inoltre, il Cu è presente nei pesticidi e nei fertilizzanti, ma può essere anche un prodotto di scarto nell'industria.

Sebbene la SOM abbia illustrato una co-variazione tra la struttura della comunità e una serie di nutrienti e metalli pesanti, rimane difficile stabilire l'effetto specifico dei vari stressori nei confronti della composizione della comunità di macroinvertebrati. Questo fatto è comunque inerente a tutti gli studi di tipo di campo, basati sull'osservazione, in cui i disturbi antropici sottopongono le comunità biologiche ad una miscela di inquinanti, sebbene l'analisi biologica della SOM abbia mostrato un modo per comparare il livello di inquinamento tra le stazioni e per valutare la qualità dell'acqua nel bacino. Questo è stato supportato dalle associazioni statisticamente significative individuate tra le variabili ambientali e i cluster biologici.

Ulteriori studi in condizioni sperimentali sarebbero necessari quindi per esaminare come particolari composti chimici agiscano ed interagiscano in natura per provocare danni ad alcuni taxa, sia in termini di schemi di presenza che di abbondanza. Su base empirica comunque, un modo comune ed efficace di valutare la qualità dell'ambiente rimane quello di interpretare la distribuzione degli indicatori biologici attraverso gradienti di condizioni ambientali.

## 5.5 CONCLUSIONI

In conclusione, la visualizzazione diretta della SOM permette di evidenziare i cambiamenti qualitativi e quantitativi delle comunità di macroinvertebrati nello spazio (clustering dei siti) e nel tempo (stagioni), insieme ai cambiamenti potenziali nei confronti dei tratti biologici in relazione ai disturbi antropici. Sebbene gli indici biologici siano uno strumento universale per la classificazione della salute fluviale, gli schemi spaziali forniscono modelli espliciti nei confronti dei quali viene valutata la deviazione da una condizione di riferimento, nella forma di punteggi o di classi di qualità delle acque (Mondy et al., 2012). A tale scopo, a causa della taglia limitata del *dataset*, non si è cercato di costruire un indice biotico che seguisse, per esempio, le ben note linee guida della *Water Framework Directive*. Tuttavia, il confronto tra i siti è stato reso possibile dal *clustering* SOM, prendendo in considerazione i gradienti dell'inquinamento chimico in senso lato. Perciò, questo metodo esemplifica una tecnica a basso costo per la valutazione della salute fluviale basata sugli indicatori ecologici.





# 6

## IMPATTO DEI METALLI PESANTI SULLE COMUNITÀ ATTRAVERSO L'ANALISI BASATA SU UN INDICE MULTIMETRICO

È stato sviluppato e validato un indice multimetrico basato sui macroinvertebrati, per valutare la salute ecologica in corsi d'acqua di piccola-media dimensione dell'Italia Centrale. I macroinvertebrati sono stati campionati in 20 siti comprendenti tratti fluviali di riferimento e alterati, in diverse stagioni, seguendo un protocollo normalizzato semplificato. Tra le 71 metriche biologiche calcolate, sono state selezionate le metriche che mostravano il miglior compromesso tra alta efficienza di discriminazione, bassa specificità, bassa ridondanza e alta stabilità in condizioni di riferimento. Infine sono state selezionate quattro metriche correlate alla diversità, tolleranza, ricchezza/abbondanza e tratti bio-ecologici. Le metriche selezionate sono state: Indice di Margalef, *Score Biological Monitoring Waters Pollution*, numero di famiglie e ricchezza relativa di *shredder*. L'indice è stato calibrato per essere generalista, ossia per rispondere sia all'inquinamento delle acque sia alla contaminazione da metalli pesanti dei sedimenti. L'Indice è stato confrontato con l'Indice Biotico Esteso, utilizzato in Italia, e validato con un *dataset* "test".

## UN INDICE MULTIMÉTRIQUE POUR ÉVALUER L'IMPACT DES MÉTAUX LOURDS SUR LES COMMUNAUTÉS AQUATIQUES

Nous avons conçu un indice multimétrique basé sur la diversité des communautés de macroinvertébrés benthiques, permettant d'évaluer plus spécifiquement la qualité des petits cours d'eau impactés par les métaux lourds. Les invertébrés ont été échantillonnés à 20 stations selon un protocole normalisé. Nous avons calculé 71 métriques sur les communautés, décrivant la diversité taxonomique (ex. Nombre de familles-de genres des différents ordres, richesse taxonomique), l'abondance des invertébrés (ex. Densités de différents groupes taxonomiques, rapports de densités), la structure des communautés (entropie, équitabilité, dominance, divers indices de biodiversité), et les traits bioécologiques des communautés. Les métriques ont été standardisées en ratios de qualité écologique (écarts aux valeurs moyennes en situation de référence). Parmi ces 71 métriques, nous n'avons retenu que celles qui présentaient la plus forte efficacité de discrimination entre stations de référence et stations impactées, la plus faible spécificité (métriques corrélées à un plus grand nombre d'indicateurs de pollution), et la plus forte stabilité (coefficient de variation) en conditions de référence. Les métriques sélectionnées sont: l'indice de Margalef, le nombre de Familles, le pourcentage de déchiqueteurs, et un indice de pollution "Score Biological Monitoring Waters Pollution" développé par Alba-Tercedor et al. (2002). L'indice que nous proposons se calcule comme la somme de ces 4 métriques pondérée chacune par leur efficacité de discrimination, divisée par la somme des efficacités de discrimination pour borner l'indice entre 0 et 1. Les limites des classes de qualité (excellente, bonne, moyenne, mauvaise, très mauvaise) ont été définies en utilisant les valeurs des médianes et quartiles des distributions de valeurs d'indice en stations perturbées et de référence. L'indice a été testé en utilisant un nouveau jeu de données, et en le confrontant à l'indice biotique IBE en vigueur en Italie. Notre indice s'est avéré pertinent pour relever l'impact écologique des métaux lourds en particulier.



## 6.1 INTRODUZIONE

Indirizzata a proteggere tutte le acque superficiali, la *Water Framework Directive* dell'Unione Europea (WFD, 2000/60/EC) ha portato allo sviluppo di strumenti pratici per la valutazione biologica della salute degli ecosistemi di acqua dolce negli Stati Membri. Un aspetto chiave delle linee guida della WFD è che la qualità ecologica sia definita in termini di similarità rispetto ad uno stato non disturbato ("di riferimento"). Questo tipo di approccio (*Reference Condition Approach*, RCA, Bailey et al., 2003) implica la caratterizzazione delle comunità biologiche (pesci, invertebrati, diatomee, macrofite) che ci si aspetta di trovare dove il disturbo antropico è assente o poco presente (Chaves et al., 2011). Recenti esempi di lavori basati sul RCA in Europa possono essere trovati ad esempio in Gabriels et al. (2010) (Belgio), Kelly et al. (2012) (Irlanda), e Mondy et al. (2012) (Francia).

Tra i potenziali strumenti per la valutazione biologica (Friberg et al., 2011), gli indici multimetrici sono al momento utilizzati comunemente (vedi Hering et al., 2006; 2010). La combinazione di diverse categorie di metriche, che rispondono efficacemente a differenti aspetti delle condizioni ambientali (cioè metriche che valutano diversità, tolleranza, ricchezza/abbondanza, tratti bio-ecologici), risulta più efficiente/affidabile rispetto all'utilizzo di una singola metrica nel provvedere valutazioni integrate della salute di un ecosistema (Barbour et al., 1999). Dal primo approccio multimettrico sviluppato da Karr (1981) per le comunità ittiche, vari indici sono stati sviluppati sulla base di diverse comunità biologiche. Ad oggi, i macroinvertebrati bentonici sono certamente il gruppo di organismi più largamente utilizzato nella valutazione della qualità delle acque (Rosenberg e Resh, 1993).

In Italia, l'attuale metodo di valutazione della qualità biologica dei corsi d'acqua sulla base dei macroinvertebrati bentonici è il metodo Macroper, basato sull'indice multimettrico STAR\_ICMi (MATTM, 2010). Il protocollo su cui si basa questo indice risulta essere abbastanza elaborato e consiste in un notevole sforzo di campionamento richiedendo la messa in atto di procedure quantitative per il prelievo dei macroinvertebrati nei diversi microhabitat presenti nel sito monitorato.

Lo scopo del presente lavoro è quello di creare un indice multimettrico alternativo, adatto per i corsi d'acqua di piccola-media dimensione, che possa basarsi su un metodo di campionamento semplificato e che possa rispondere a particolari categorie di inquinanti (come i metalli pesanti).

In particolare, il metodo di campionamento semplificato utilizzato per la raccolta dei macroinvertebrati nel presente lavoro è basato su un campionamento da sponda a sponda in una sezione rappresentativa del tratto del corso d'acqua, con un tempo standardizzato (protocollo di campionamento utilizzato per l'Indice Biotico Esteso, IBE). Risulta pertanto semplificato rispetto a quello attualmente proposto dalle normative (cioè basato sulla stima percentuale della copertura dei microhabitat, con un prelievo percentuale per ciascun microhabitat rispetto alla copertura). Il metodo di campionamento semplificato impiegato risulta essere a basso sforzo, in particolar modo per quanto riguarda campagne di campionamento numerose e frequenti.

Nella calibrazione dell'indice, oltre ai principali inquinanti delle acque, sono stati presi in considerazione anche i metalli pesanti dei sedimenti come categoria di disturbo antropico da tenere in considerazione per la valutazione della risposta delle metriche dell'indice.

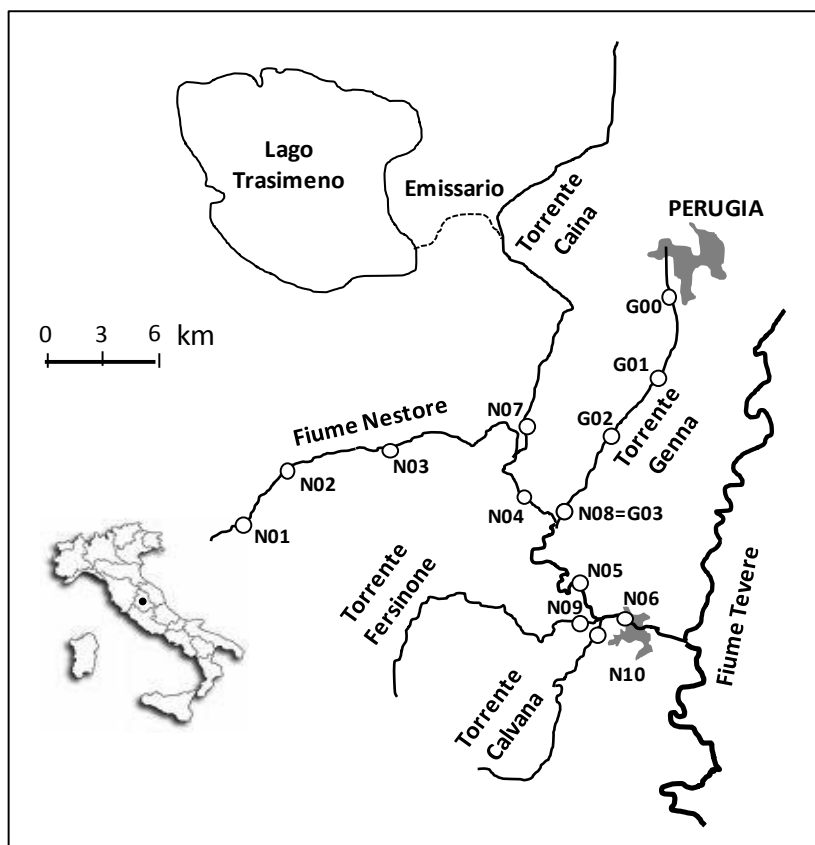
La creazione e la calibrazione dell'Indice multimetrico alternativo si basa principalmente sulla metodologia stabilita per la Francia metropolitana da Mondy et al. (2012), e su quella utilizzata per la creazione dell'Indice Biologique Macroinvertébrés des Antilles (IBMA) per Martinique e Guadaloupe (Touron-Poncet et al., 2014). Come metodo di controllo della validità, è stata comparata l'efficienza dell'Indice multimetrico sviluppato rispetto a quella dell'IBE (Indice Biologico Esteso; Ghetti, 1997) e ne è stata validata l'efficacia anche nei confronti di un *dataset* "test", non utilizzato e pertanto indipendente dal *dataset* "di sviluppo" usato per la creazione dell'indice stesso.

## 6.2 MATERIALI E METODI

### *Area di studio*

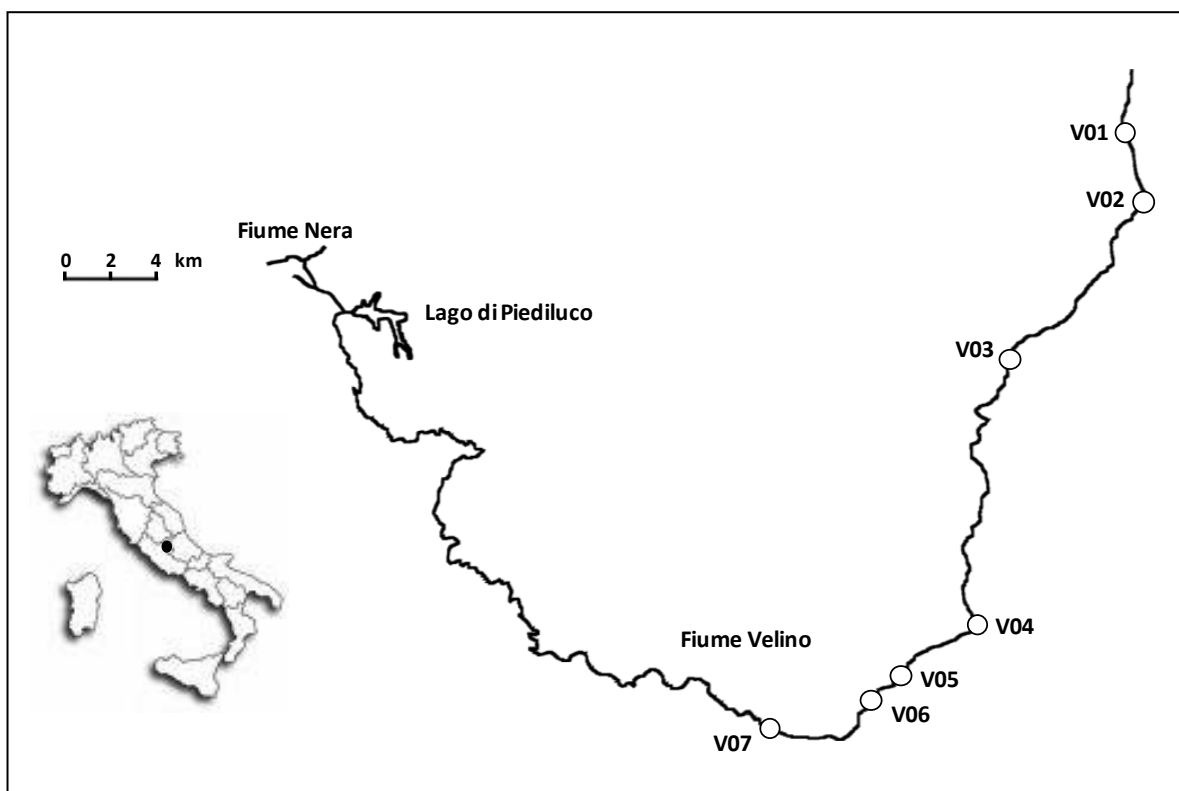
Lo studio ha preso in considerazione due differenti bacini fluviali in Italia Centrale (Fig. 6.1, 6.2).

Il bacino del Fiume Nestore, Umbria, Italia Centrale. L'area del bacino è di 1116 km<sup>2</sup>, e la lunghezza del corso d'acqua principale è di 48 km (Mearelli et al., 1996). Il Fiume Nestore è un affluente di destra del Fiume Tevere. Nasce nella parte sud-occidentale dell'Umbria da delle sorgenti multiple e localizzate (Lorenzoni et al., 2004). I principali affluenti di sinistra del Fiume Nestore sono i torrenti Genna (23 km) e Caina (31 km) (rispettivamente parte centro-orientale e settentrionale del bacino). I principali affluenti di destra sono i torrenti Fersinone (25 km) e Calvana (18 km) (parte sud-occidentale del bacino). Si tratta di corsi d'acqua e tratti di corsi d'acqua perenni appartenenti alla IdroEcoRegione (HER) Colline Toscane (HER cod. 67) (secondo ARPA Umbria Tipo 12: 067\_P\_SUP\_D2\_N ).



**Fig. 6.1** - Cartina dell'area di studio e localizzazione delle stazioni di campionamento (Bacino del Fiume Nestore) (G: 00 - 03; N: 01 - 10).

Il bacino del Fiume Velino, Lazio ed Umbria, Italia Centrale. L'area del bacino è di 2324 km<sup>2</sup>, e la lunghezza del corso d'acqua è di 88 km (Provincia di Rieti, 2012). Il Fiume Velino è un affluente del Fiume Nera e quindi sub-affluente del Fiume Tevere. Nasce dal Monte Pozzoni (1903 m s.l.m.). Il fiume termina il suo corso in Umbria, riversando le sue acque nel Fiume Nera, creando la Cascata delle Marmore, alta 165 metri. Si tratta di un corso d'acqua perenne appartenente alla HER Appennino centrale (HER cod. 65) (Secondo ARPA Umbria Tipo 5: 065\_P\_SOT\_D5\_N).



**Fig. 6.2** - Cartina dell'area di studio e localizzazione delle stazioni di campionamento (Fiume Velino) (V: 01 - 07).

### *Campagna di campionamento*

Venti siti sono stati selezionati in modo da prendere in considerazione tratti fluviali sia “di riferimento” che “inquinati”; in totale sono stati presi in considerazione 72 campioni.

L'indagine sul bacino del Fiume Nestore si è svolta tra Marzo 2010 ed Ottobre 2012 ed è stata composta da 4 diversi campionamenti stagionali (Marzo, Giugno, Agosto ed Ottobre). Sono state selezionate tredici siti di campionamento, 6 lungo il corso del Fiume Nestore e 7 negli affluenti principali (Torrente Caina; Torrente Genna; Torrente Fersinone; Torrente Calvana). In totale i campioni presi in considerazione sono stati 47.

L'indagine sul Fiume Velino si è svolta tra Novembre 2010 e Gennaio 2012 ed è stata composta da 4 diversi campionamenti stagionali (Aprile, Settembre e Novembre e Gennaio). Sono stati

selezionati sette siti di campionamento nella porzione medio-alta del corso d'acqua. In totale i campioni presi in considerazione sono stati 25.

In ogni sito, i campioni di macroinvertebrati sono stati raccolti mediante un retino immanicato equipaggiato con una rete con maglie da 335  $\mu\text{m}$ . Il tempo di campionamento standardizzato era di 10 minuti, da sponda a sponda, prendendo in considerazione tutti i microhabitat presenti (Ghetti e Bonazzi, 1981). I campioni sono stati fissati in alcol al 70%. In laboratorio, i macroinvertebrati sono stati identificati a livelli tassonomici diversi utilizzando diverse chiavi tassonomiche (Tachet et al., 2006; Moretti, 1983; Carchini, 1983; Campaioli et al., 1999; Consiglio, 1980; Belfiore, 1983; Sansoni, 1998), e contati (vedi Tab. 6.1 per il livello di identificazione).

**Tabella 6.1** - Livelli tassonomici richiesti per il calcolo dell'Indice.

<b>Taxa</b>	<b>Livello tassonomico richiesto</b>
Bivalvia	Genere
Coleoptera	Genere
Crustacea	Genere
Diptera (ad eccezione di * e °)	Famiglia
*Clinocerinae, Culicinae, Orthoclaadiinae, Prosimuliinae, Tanypodinae	Sottofamiglia
°Chironomini, Hexatomini, Limoniini, Pediciini, Tanytarsini	Tribù
Ephemeroptera	Genere
Gastropoda	Genere
Hemiptera	Genere
Hirudinea	Genere
Megaloptera	Genere
Nematomorpha	Famiglia
Odonata	Genere
Oligochaeta	Famiglia
Plecoptera	Genere
Thricoptera	Genere
Turbellaria	Genere

#### *Caratterizzazione chimica e chimico-fisica delle acque superficiali*

I seguenti parametri chimico-fisici delle acque sono stati misurati *in situ*: temperatura, ossigeno disciolto (Ossimetro F-Simplair Syland Scientific, precisione 1% del valore di scala, campo di misura: 0,0 - 20,0  $\text{O}_2 \text{ mg L}^{-1}$ ), pH (pHmetro Hanna Instruments HI-98150, scala: -4,00 - 19,99, risoluzione 0,01 pH, precisione  $\pm 0,02 \text{ pH}$ ) e conducibilità (HI8733-Hanna Instruments, scala: 0 - 1999  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , precisione 1%, risoluzione 1  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ).

Sono stati raccolti campioni di acqua in bottiglie di polietilene da 500 mL e conservati in frigorifero a 5 °C per la successiva caratterizzazione anionica e cationica e per la determinazione del *Chemical Oxygen Demand* (COD). La determinazione del COD è stata effettuata attraverso metodo colorimetrico (Colorimetro Smart 2 La Motte Company, COD Low Range Reagent Kit, 0 - 150  $\text{mg L}^{-1}$ ).



COD, limite di rilevamento 0,5 mg L<sup>-1</sup>). Le concentrazioni delle specie di anioni e cationi (anioni = F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>, SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>; cationi = Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup>) sono state determinate attraverso Cromatografia Ionica Soppressa con detector a conducibilità utilizzando un cromatografo Dionex Series 4500i. Sono state utilizzate soluzioni standard (Fluka-TraceCERT® Standard Solutions, 1000 mg L<sup>-1</sup> ± 4 mg L<sup>-1</sup>) in acqua ultrapura (18,2 MΩ at 25 °C) per preparare opportuni standard di calibrazione. Le analisi sono state effettuate previa filtrazione dei campioni con filtri di cellulosa (0,2 µm) (Selvaggi et al., 2010).

#### *Determinazione dei metalli pesanti nei sedimenti*

La concentrazione dei metalli pesanti (Cr, Cd, Cu, Ni, Zn, Pb) per i campioni del 2010 del Bacino del Fiume Nestore, è stata determinata mediante Spettrometria ad Assorbimento Atomico in fiamma (Perkin-Elmer 3300, limite strumentale di rilevazione 0,01 - 0,20 mg L<sup>-1</sup>). Sono state utilizzate soluzioni standard (Fluka-TraceCERT®, 1000 mg L<sup>-1</sup> ± 4 mg L<sup>-1</sup>) in acido nitrico al 2% per preparare appropriati standard di calibrazione.

La concentrazione dei metalli pesanti (Cr, Cd, Cu, Ni, Zn, Pb) per i campioni del 2012 del Bacino del Fiume Nestore e per i campioni del Fiume Velino sono stati determinati mediante Spettroscopia di Emissione Ottica con Plasma Accoppiato Induttivamente (ICP-OES Ultima2, HORIBA Scientific, limite strumentale di rilevazione: 0,14 - 1,58 µg L<sup>-1</sup>) equipaggiato con un nebulizzatore a ultrasuoni (CETAC Technologies, U-5000AT). Sono state utilizzate soluzioni standard (ICP multi-element standard solution IV CertiPUR®, VWR Merck Chemicals and Reagents, 1000 mg L<sup>-1</sup>) in acido nitrico per preparare appropriati standard di calibrazione.

Tutte le misurazioni dei metalli pesanti nei sedimenti sono basate su due repliche.

I campioni di sedimento sono stati ottenuti dragando lo strato superficiale (ca. 5 cm) dei sedimenti del fondale con una draga manuale. I campioni (500 g) sono stati conservati in bottiglie di polietilene e congelati a -18 °C (MATT e APAT, 2005).

Tutti i campioni di sedimento sono stati essiccati all'aria, disgregati usando mortaio e pestello e fatti passare attraverso un setaccio con maglie di 2 mm, essiccati a 105°C per 24h e digeriti come segue: sono stati aggiunti al campione (2,0 g) 15 mL di acido nitrico ultrapuro concentrato (Fluka, TraceSELECT®, per l'analisi di tracce ≥ 69%) e la miscela è stata riscaldata a 160 °C per 1h; poi, il recipiente è stato raffreddato a temperatura ambiente e sono stati aggiunti 10 mL di acido cloridrico ultrapuro concentrato (Fluka, TraceSELECT®, per l'analisi di tracce ≥ 37%) e il recipiente è

stato riscaldato a 160°C per 1h. La miscela è stata raffreddata, filtrata (filtri Whatman Grade No. 42, porosità 2,5 µm) e diluita con acqua ultrapura a 50 mL.

*Impostazione delle metriche e Least Impaired River Reaches (LIRR, Tratti Fluviali Meno Alterati) e Impaired River Reaches (IRR, Tratti Fluviali Alterati)*

Sono state calcolate 71 diverse metriche. Queste metriche sono state suddivise in 4 categorie: (1) indici di diversità, (2) indici complessi che prendono in considerazione la tolleranza dei taxa, (3) metriche correlate alla ricchezza/abbondanza tassonomica (numero di individui o specie all'interno di un particolare gruppo tassonomico o combinazione di taxa), (4) tratti bio-ecologici (ad esempio percentuale di individui o specie appartenenti ad un particolare Gruppo Trofico Funzionale, FFG).

Seguendo i requisiti della WFD, le metriche biologiche devono essere espresse in termini di Rapporti di Qualità Ecologica (*Ecological Quality Ratios*, EQR), cioè i rapporti tra i valori osservati e quelli attesi, misurati in condizioni di riferimento. È stato definito lo stato di ogni sito (LIRR vs IRR) sulla base di studi ed indagini precedenti e sulla base della valutazione delle attività umane presenti nei territori in esame.

I 2 siti più a monte del Fiume Nestore, i siti dei torrenti Fersinone e Calvana, insieme con tutti i siti del Fiume Velino, sono stati classificati come Tratti Fluviali Meno Alterati (*Least Impaired River Reaches*, LIRR) (per un totale di 38 campioni). I restanti 4 siti del Fiume Nestore, e i siti dei torrenti Caina e Genna, sono stati classificati come Tratti Fluviali Alterati (*Impaired River Reaches*, IRR) (per un totale di 34 campioni) (Fig. 6.1, 6.2).

All'interno di ognuno di questi due gruppi (LIRR and IRR), sono stati selezionati in modo casuale, rispettivamente 24 e 25 campioni; questo *dataset* è stato utilizzato come *dataset* "di sviluppo". I restanti campioni (14 campioni LIRR e 9 campioni IRR) sono stati utilizzati come *dataset* "test".

*Standardized Effect Size (SES, Standardizzazione dell'Effetto delle Dimensioni), valori delle metriche migliori e peggiori*

Allo scopo di comparare i valori delle metriche ottenuti in diverse tipologie fluviali, i valori osservati delle metriche sono stati trasformati in deviazioni normalizzate rispetto ai valori misurati in condizioni di riferimento (Standardizzazione dell'Effetto delle Dimensioni, *Standardized Effect Size*, SES); equazione [1] (Gotelli e McCabe, 2002). I valori SES sono stati calcolati come segue:

$$SES = (Metrica_{oss} - media_{rif}) / ds_{rif} [1]$$

con “Metrica\_oss” il valore osservato della metrica, “media<sub>rif</sub>” e “ds<sub>rif</sub>” la media e la deviazione standard della distribuzione della metrica in condizioni di riferimento.

La normalizzazione SES ha consentito di identificare la direzione della deviazione dei valori nei LIRR e ha permesso una comparazione diretta delle metriche, indipendentemente dalla tipologia fluviale.

Sono stati determinati il più alto ed il più basso valore che la metrica poteva assumere nell'intero *dataset*.

#### *Normalizzazione delle metriche*

Seguendo le linee guida della WFD, i valori osservati delle metriche sono stati trasformati in rapporti di qualità ecologica (*Ecological Quality Ratios*, EQR) tra condizioni osservate e di riferimento. Gli *Ecological Quality Ratios* (EQR) sono stati calcolati seguendo Hering et al. (2006), utilizzando la formula [2] per le metriche che decrescevano tra le condizioni di riferimento e quelle alterate e utilizzando la formula [3] per le metriche che crescevano tra le condizioni di riferimento e quelle alterate (Mondy et al. 2012).

$$EQR = (oss - \text{più basso}) / (\text{più alto} - \text{più basso}) [2]$$

$$EQR = 1 - (oss - \text{più basso}) / (\text{più alto} - \text{più basso}) [3]$$

con "oss" si intende: il valore della metrica osservato in un dato campione; “più alto” e “più basso” corrispondono rispettivamente ai valori più alti e più bassi per la metrica.

Gli EQR sono stati limitati tra 0 e 1. Se i valori osservati risultavano maggiori del valore più alto (se la qualità era più alta rispetto al *dataset* di riferimento), il valore dell'EQR era limitato a 1. Al contrario, se il valore era minore del valore più basso dell'EQR (cioè se la qualità era minore del peggior valore), il valore dell'EQR era fissato a 0.

#### *Selezione delle metriche*

Lo scopo è stato quello di determinare le metriche che distinguessero meglio i siti non alterati da quelli alterati. Sono state selezionate le metriche che esibivano il migliore compromesso tra (i) alta

efficienza di discriminazione (DE), (ii) bassa specificità e (iii) alta stabilità in condizioni di riferimento (Mondy et al., 2012).

Prima di tutto, è stato effettuato un test Mann-Whitney sui valori EQR per ogni metrica; se c'era una differenza significativa tra i valori EQR dei LIRR e degli IRR, la metrica era selezionata per lo step successivo.

La DE di una metrica era calcolata come la proporzione degli assemblaggi IRR con valori EQR più bassi del primo quartile della distribuzione dei valori LIRR. La stabilità di una metrica in condizioni di riferimento (cioè i LIRR) è stata valutata utilizzando il coefficiente di variazione (CV) della distribuzione dei valori EQR degli assemblaggi LIRR. Una stima robusta della DE e del CV è stata ottenuta attraverso una procedura *bootstrap* (media di 100 calcoli, ogni calcolo utilizza il 60% dei siti selezionati casualmente dal *dataset*). All'inizio sono state quindi selezionate le metriche che esibivano simultaneamente un'alta DE e un'alta stabilità nei LIRR (DE media  $\geq 0,6$  e CV medio nei LIRR  $\leq 1/3$ ).

Dal momento che si puntava a costruire un indice generalista, sono state preferite le metriche con una bassa specificità, cioè sono state selezionate le metriche che erano significativamente correlate (regressione lineare,  $\alpha < 0.05$ ) ad un alto numero di variabili ambientali riflettenti una contaminazione. Quindi sono state selezionate le metriche significativamente correlate ad almeno 8 variabili della chimica delle acque su 15 totali, e ad almeno 3 variabili dei metalli pesanti nei sedimenti su un totale di 6 (vedi variabili in Tabella 6.2).

Per eliminare la ridondanza, le metriche candidate che fornivano la stessa informazione biologica o ecologica (cioè appartenenti alla stessa categoria) sono state divise in gruppi omogenei. Solo le metriche con la più bassa specificità, la più alta DE e il più basso CV, per un dato gruppo di metriche, sono state selezionate per una possibile inclusione nell'indice multimetrico. Infine, per limitare il numero di metriche, le metriche selezionate precedentemente sono state inserite in una matrice di correlazione. Sono state scelte le metriche migliori (non ridondanti in termini di informazione bio-ecologica, con più alta DE e basso CV e correlate ad un più alto numero di parametri ambientali) di ogni gruppo.

**Tabella 6.2** - Valori medi, minimi (Min) e massimi (Max) della chimica delle acque e dei metalli pesanti dei sedimenti per i *Least Impaired River Reaches* (LIRR) e *Impaired River Reaches* (IRR), dataset “di sviluppo”.

		LIRR			IRR		
		Media	Min	Max	Media	Min	Max
<b>Chimica delle acque</b>	Conducibilità ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	544,46	250,00	814,00	735,20	506,00	996,00
	pH	8,01	7,15	8,65	8,01	7,20	8,42
	DO ( $\text{mg L}^{-1}$ )	10,19	7,00	12,80	7,31	1,20	11,90
	COD ( $\text{mg L}^{-1} \text{O}_2$ )	7,33	5,00	36,00	23,80	5,00	80,00
	Fluoruri ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0,46	0,14	1,50	0,69	0,20	3,43
	Cloruri ( $\text{mg L}^{-1}$ )	14,33	2,14	79,45	59,21	18,94	125,43
	Nitriti ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0,10	0,10	0,10	1,10	0,10	3,91
	Nitrati ( $\text{mg L}^{-1}$ )	2,24	0,46	9,95	12,48	0,77	43,34
	Fosfati ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0,20	0,20	0,20	1,95	0,20	8,18
	Solfati ( $\text{mg L}^{-1}$ )	34,70	0,99	108,90	47,28	14,39	70,44
	Sodio ( $\text{mg L}^{-1}$ )	11,36	1,69	51,17	44,98	20,05	78,32
	Ammonio ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0,21	0,10	1,26	5,07	0,36	17,66
	Potassio ( $\text{mg L}^{-1}$ )	1,49	0,24	5,53	6,42	1,41	16,53
	Magnesio ( $\text{mg L}^{-1}$ )	17,08	0,74	35,62	15,41	8,57	22,30
	Calcio ( $\text{mg L}^{-1}$ )	109,10	65,57	171,78	103,29	65,33	144,02
<b>Metalli pesanti dei sedimenti</b>	Cr ( $\text{mg Kg}^{-1}$ )	14,42	0,98	49,66	21,41	8,10	53,99
	Cd ( $\text{mg Kg}^{-1}$ )	0,55	0,03	2,22	2,01	0,75	4,37
	Cu ( $\text{mg Kg}^{-1}$ )	11,76	1,73	34,54	25,90	10,51	57,37
	Ni ( $\text{mg Kg}^{-1}$ )	25,27	3,09	69,34	38,25	18,55	53,34
	Zn ( $\text{mg Kg}^{-1}$ )	49,06	5,46	195,56	94,45	62,78	248,88
	Pb ( $\text{mg Kg}^{-1}$ )	10,99	1,19	45,24	24,88	0,50	53,81

### Calcolo dell'indice

L'indice è stato calcolato secondo la seguente formula:

$$\text{Indice} = \sum (DE_m \times EQR_m) / \sum DE_m$$

Con  $DE_m$  si intende: l'efficienza di discriminazione della metrica “m”; con  $EQR_m$ : il valore EQR della metrica “m”.

### Limiti delle classi di qualità ecologiche

In accordo con la WFD, sono state proposte cinque classi di qualità, corrispondenti a differenti livelli di alterazione, per suddividere i punteggi dell'Indice (cioè “elevata”, “buona”, “sufficiente”, “scarsa”, “cattiva” qualità ecologica).

La mediana e il primo quartile della distribuzione dell'Indice nei LIRR sono stati considerati come i limiti “elevata-buona” e “buona-sufficiente”, rispettivamente (Fig. 6.3). Per la definizione dei limiti

“sufficiente-scarso” e “scarso-cattivo”, sono stati considerati i punteggi della distribuzione negli IRR: il terzo quartile e la mediana della distribuzione dell’Indice negli IRR sono stati considerati come i limiti “sufficiente-scarso” e “scarso-cattivo”, rispettivamente.

#### *Test dell’Indice*

Le efficienze di discriminazione e i coefficienti di variazione dell’Indice nei LIRR sono state calcolate su tutto il *dataset* “di sviluppo” per valutare la performance dell’Indice e la sua stabilità nei LIRR. Quindi, la DE e il CV dell’Indice sono stati comparati con le efficienze di discriminazione e i coefficienti di variazione dell’Indice Biologico Esteso (IBE) (Ghetti, 1997). L’IBE è stato il metodo ufficiale utilizzato per valutare la qualità ecologica dei corsi d’acqua in Italia per diversi anni, e viene ancora utilizzato in particolari situazioni. Per valutare la robustezza dell’efficienza di discriminazione dell’Indice, i punteggi dell’Indice sono stati calcolati sul *dataset* “test”, e sono state comparate le DE ottenute con il *dataset* “di sviluppo” e con il *dataset* “test”. Infine, è stata saggiata la stabilità dei valori dell’Indice nei LIRR attraverso l’utilizzo di un test Kolmogorov-Smirnov. Questo test è stato utilizzato per valutare le differenze significative nella distribuzione dei valori dell’Indice nei LIRR tra i *dataset* “di sviluppo” e “test”.

Tutte le procedure statistiche sono state effettuate con il software R (The R Core Team, Version 3.0.3, 2014).

### 6.3 RISULTATI

#### Selezione delle metriche

Tra le 71 metriche saggiate, 29 metriche hanno mostrato una DE media maggiore di 0,6 e un CV medio nei LIRR  $\leq 1/3$ . Venticinque di queste 29 metriche rispondevano significativamente ad almeno 8 variabili della chimica delle acque (su 15) e a 3 variabili dei metalli pesanti nei sedimenti (su 6), contemporaneamente (Tab. 6.3). Di queste 25 metriche, dopo aver eliminato le metriche che fornivano un'informazione ridondante e che erano correlate, sono state selezionate le migliori metriche di ogni gruppo (considerando DE, CV e specificità).

**Tabella 6.3** - Descrizione **(a)**, risposta osservata, efficienza di discriminazione (DE), coefficiente di variazione (CV) e risposte alle 15 variabili della chimica delle acque e delle 6 variabili dei metalli pesanti nei sedimenti delle 25 metriche candidate **(b)**. Le metriche finali sono indicate in grassetto.

(a)

	METRICHE CANDIDATE	Definizione
Diversità	Dominance	Indice di dominanza
	Simpson_1-D	Indice di uniformità di Simpson
	Shannon_H	Indice di diversità di Shannon
	Brillouin	Indice di diversità di Brillouin
	<b>Margalef</b>	Indice di diversità di Margalef
	Fisher_alpha	Indice di diversità di Fisher $\alpha$
	ShannonFamily	Indice di diversità di Shannon a livello di famiglia
Tolleranza	BWMP	Biological Monitoring Working Party Score System (Armitage et al., 1983)
	<b>SBWMP</b>	Score Biological Monitoring Waters Pollution (Alba-Tercedor et al. 2002)
	ASPT	Average Score Per Taxon (Armitage, 1983)
	SASPT	Average Score Per Taxon modificato (Alba-Tercedor et al., 2002)
	IBE	Indice Biotico Esteso (Ghetti, 1997)
Ricchezza ed abbondanza	Taxa_S	Numero di taxa
	<b>N_Families</b>	Numero di famiglie
	%S_Oligochaeta	Ricchezza relativa di Oligochaeta
	%S_Hirudinea	Ricchezza relativa di Hirudinea
	%S_Annelida	Ricchezza relativa di Annelida
	%S_EPT	Ricchezza relativa di Ephemeroptera + Plecoptera + Thricoptera
	%S_EPTC	Ricchezza relativa di Ephemeroptera + Plecoptera + Thricoptera + Coleoptera
	%S_EP	Ricchezza relativa di Ephemeroptera + Plecoptera
	N_Families_EPTC	Numero di famiglie di Ephemeroptera + Plecoptera + Thricoptera + Coleoptera
	N_Families_EPT	Numero di famiglie di Ephemeroptera + Plecoptera + Thricoptera
Tratti bio-ecologici	%Q_GC	Abbondanza relativa di gathering collectors
	%S_GC	Ricchezza relativa di gathering collectors
	<b>%S_SH</b>	Ricchezza relativa di shredders

Tabella 6.3 - segue

(b)

METRICHE CANDIDATE	Risposta osservata	DE	CV	RISPOSTA ALLE VARAIBILI	
				CHIMICA ACQUE	METALLI PESANTI
Dominance	Incremento	0,76	0,22	9	3
Simpson_1-D	Decremento	0,76	0,22	9	3
Shannon_H	Decremento	0,76	0,26	9	4
Brillouin	Decremento	0,81	0,27	9	4
<b>Margalef</b>	Decremento	1,00	0,22	11	5
Fisher_alpha	Decremento	1,00	0,30	10	4
ShannonFamily	Decremento	0,84	0,29	9	4
BWMP	Decremento	1,00	0,22	10	6
<b>SBWMP</b>	Decremento	1,00	0,22	10	6
ASPT	Decremento	1,00	0,13	10	4
SASPT	Decremento	1,00	0,16	9	4
IBE	Decremento	1,00	0,22	9	6
Taxa_S	Decremento	1,00	0,22	10	6
<b>N_Families</b>	Decremento	1,00	0,19	10	6
%S_Oligochaeta	Incremento	0,84	0,08	9	3
%S_Hirudinea	Incremento	0,88	0,08	9	4
%S_Annelida	Incremento	1,00	0,07	9	4
%S_EPT	Decremento	1,00	0,27	9	6
%S_EPTC	Decremento	1,00	0,21	9	5
%S_EP	Decremento	0,96	0,32	10	4
N_Families_EPTC	Decremento	1,00	0,27	9	6
N_Families_EPT	Decremento	1,00	0,31	9	6
%Q_GC	Incremento	0,87	0,33	9	6
%S_GC	Incremento	0,62	0,11	9	3
<b>%S_SH</b>	Decremento	0,92	0,24	10	6

Infine, l'Indice era composto infine da quattro metriche: l'indice di diversità di Margalef, SBWMP, il numero di famiglie e la ricchezza relativa di *shredder* (definizione delle metriche in Tab. 6.3). I valori massimi e minimi di ogni metrica sono forniti in Tab. 6.4.

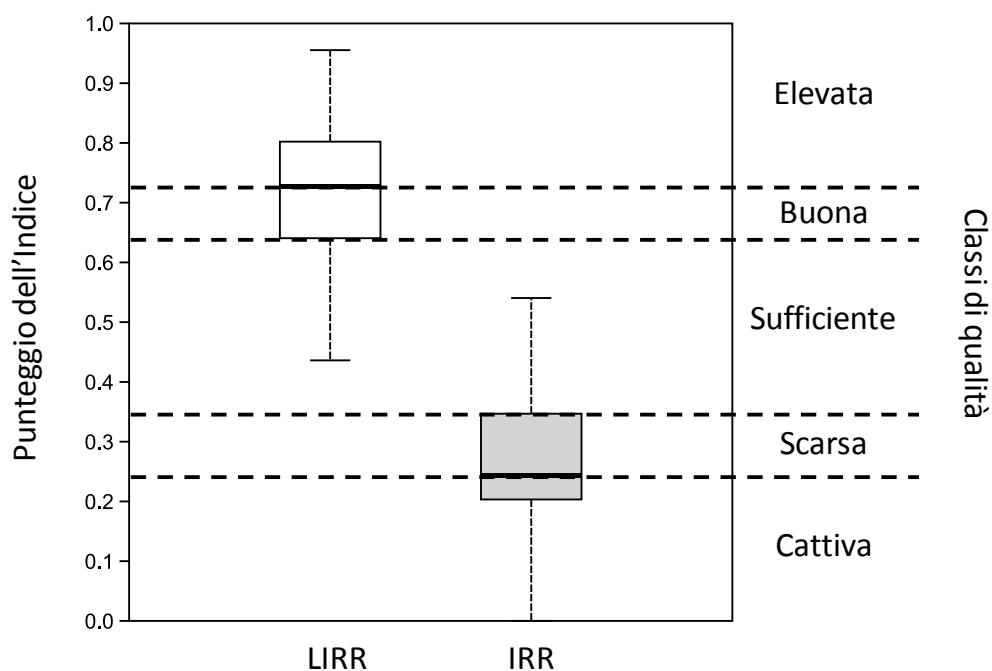
**Tabella 6.4** - I valori massimi e minimi (valori grezzi prima della normalizzazione) delle quattro metriche individuali dell'Indice.

	Valore max	Valore min
<b>Margalef</b>	0,1625	4,863
<b>SBWMP</b>	4	162
<b>N_Famiglie</b>	2	26
<b>%S_SH</b>	0	36

#### *Limiti delle classi di qualità ecologiche*

I valori dell'Indice erano compresi tra 0 e 0,9552 per il *dataset* "di sviluppo". I limiti "elevata-buona", "buona-sufficiente", "sufficiente-scarso" e "scarso-cattiva" erano: 0,7270, 0,6451, 0,3239 e 0,2438, rispettivamente (Fig. 6.3).

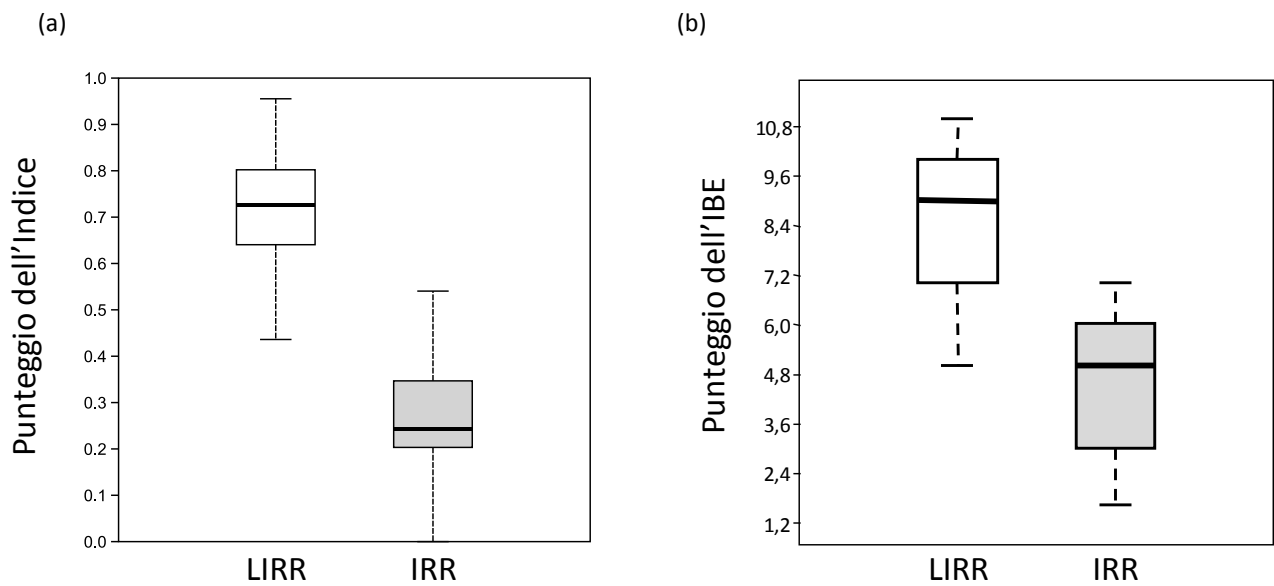




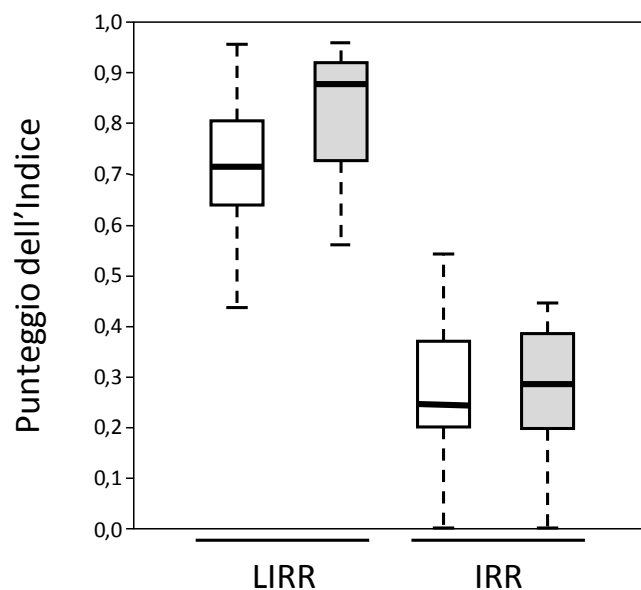
**Fig. 6.3** - Limiti della classi di qualità ecologica (linee nere tratteggiate) dell'Indice. I *box plots* rappresentano la distribuzione dei punteggi dell'Indice nei Least Impaired River Reaches (LIRR; scatola bianca) e negli *Impaired River Reaches* (IRR; scatole grigie). Le scatole delineano il 25esimo e il 75esimo percentile della distribuzione; le linee spesse rappresentano la mediana; i *whiskers* si estendono fino al massimo e al minimo.

#### Test dell'Indice

La DE e il CV dell'Indice nel *dataset* "di sviluppo" erano uguali ad 1 e 0,1742, rispettivamente (Fig. 6.4a). I valori dell'IBE nel *dataset* "di sviluppo" erano DE = 1 e CV = 0,1787 (Fig. 6.4b). La DE e il CV dell'Indice nel *dataset* "test" erano uguali a 1 e 0,1567. La distribuzione dei punteggi dell'Indice negli assemblaggi LIRR nel *dataset* "di sviluppo" e "test" non mostrava una differenza significativa (test Kolmogorov-Smirnov con il *dataset* "test":  $D = 0,416$ ,  $p = 0,06655$ ) (Fig. 6.5).



**Fig. 6.4** - Distribuzione dei punteggi dell'Indice **(a)** e dell'IBE **(b)** nei *Least Impaired River Reaches* (LIRR; scatola bianca) e negli *Impaired River Reaches* (IRR; scatole grigie). Le scatole delineano il 25esimo e il 75esimo percentile della distribuzione; le linee spesse rappresentano la mediana; i *whiskers* si estendono fino al massimo e al minimo.



**Fig. 6.5** - Distribuzione dei punteggi dell'Indice nei *Least Impaired River Reaches* (LIRR) e negli *Impaired River Reaches* (IRR) per il *dataset* "di sviluppo" (scatole bianche) e per il *dataset* "test" (scatole grigie). Le scatole delineano il 25esimo e il 75esimo percentile della distribuzione; le linee spesse rappresentano le mediane; i *whiskers* si estendono al massimo e al minimo.

## 6.4 DISCUSSIONE

L'indice multimettrico proposto è uno strumento sensibile e robusto che può essere facilmente applicato per valutare le condizioni biologiche dei corsi d'acqua dell'Italia Centrale (riferibili alle tipologie HER Colline Toscane e Appennino centrale) attraverso l'utilizzo di un protocollo di campionamento semplificato. L'Indice proposto è un indice generalista, capace di discriminare la pressione antropica (compreso l'inquinamento da metalli pesanti) rispetto alla variabilità naturale, che è un'importante condizione da tenere in considerazione nello sviluppo di un indice (Karr e Chu, 1999; Moya et al., 2007).

L'efficienza di discriminazione (DE) dell'indice proposto (sia nel *dataset* "di sviluppo" che in quello "test") è di 1, l'indice proposto riesce quindi a separare con efficacia i siti a basso impatto (LIRR) rispetto a quelli impattati (IRR), e presenta un CV di 0,1742 e 0,1567 (rispettivamente nel *dataset* "di sviluppo" e in quello "test"). La verifica dell'Indice con un *dataset* "test" ha permesso di dimostrare la sua stabilità nei LIRR (nessuna differenza significativa tra il *dataset* "di sviluppo" e il *dataset* "test") e la sua robustezza in termini di efficienza di discriminazione. L'IBE, calcolato sul *dataset* "di sviluppo" risulta avere un'efficienza di discriminazione pari a quella dell'Indice (DE = 1) e un coefficiente di variazione di 0,1787, leggermente superiore a quello dell'Indice proposto. L'Indice multimettrico, risponde quindi quasi nella stessa maniera dell'IBE.

L'Indice finale è composto solamente da 4 delle 71 metriche considerate. L'Indice combina diversi tipi di metriche connesse alla diversità, alla tolleranza, alla ricchezza/abbondanza e ai tratti bio-ecologici. Le metriche selezionate legate alla diversità e alla ricchezza/abbondanza sono l'indice di diversità di Margalef e il numero di famiglie, che sono tra gli indicatori più affidabili in diversi indici multimettrici, e mostrano una buona risposta al disturbo antropico (Böhmer et al., 2004; Gabriels et al., 2010). Lo *Score Biological Monitoring Waters Pollution* è invece una metrica legata alla sensibilità dei taxa, in quanto assegna un punteggio decrescente ad ogni famiglia, a seconda della sensibilità. La percentuale dei taxa *shredder* (tagliuzzatori) presenti rispetto a tutti gli altri taxa rientra tra i tratti bio-ecologici dei macroinvertebrati. Gli *shredder* decrescono consistentemente in risposta alle alterazioni antropiche (Compin e Cereghino, 2007; Couceiro et al., 2012; Miserendino e Masi, 2010).

Il livello di identificazione tassonomica è una questione importante nelle valutazioni biologiche (Bailey et al., 2001). Molti metodi rapidi di biovalutazione preferiscono l'identificazione a livello di famiglia, per rapidità, convenienza e costi-benefici (Thorne e Williams, 1997). Una risoluzione tassonomica più dettagliata fornisce informazioni ecologiche più precise, consentendo così di

rilevare stressori multipli e di discriminare più accuratamente le differenze nell'integrità biologica (Dolédec e Statzner, 2010). Per questo indice è stata combinata l'identificazione a livello di famiglia (ad esempio Oligochaeta, e alcuni taxa di Diptera), a livello di sottofamiglia (alcuni taxa di Diptera), a livello di tribù (alcuni taxa di Diptera) e a livello di genere (la maggior parte dei taxa come ad esempio Thricoptera, Coleoptera, Ephemeroptera), per avere un buon compromesso tra le necessità delle indagini di routine e la sensibilità degli organismi.

L'Indice, nel complesso, soddisfa i requisiti della WFD, prendendo in considerazione la qualità ecologica in termini di similarità rispetto a uno stato di riferimento (RCA) attraverso il calcolo degli EQR per ogni metrica, e prendendo in considerazione, con le diverse metriche, dell'abbondanza dei taxa, della loro diversità e sensibilità all'inquinamento.

## 6.5 CONCLUSIONI

L'Indice multimettrico sviluppato si propone come un ulteriore e nuovo strumento per il biomonitoraggio dei corsi d'acqua di piccola-media dimensione dell'Italia Centrale. Come indice generalista, l'Indice è sensibile ai diversi tipi di inquinamento ed impatto antropico e considera sia le caratteristiche tassonomiche che i tratti funzionali delle comunità di macroinvertebrati bentonici. Inoltre, si basa sullo stesso protocollo di campionamento dell'indice più conosciuto e utilizzato da tempo in Italia (l'Indice Biotico Esteso, IBE), rispetto al quale si richiede anche un livello inferiore di riconoscimento dei taxa macrobentonici, ed è quindi di facile e veloce applicazione, pur soddisfacendo la maggior parte dei requisiti della *Water Framework Directive* dell'Unione Europea (WFD).

# 7

## CONCLUSIONI

I risultati delle indagini condotte sulla contaminazione da metalli pesanti nei sedimenti fluviali attraverso l'uso della specie bioindicatrice *Chironomus riparius* hanno confermato che le malformazioni morfologiche del *mentum* rappresentano un *endpoint* valido per una valutazione degli effetti tossici. L'entità delle larve malformate può essere considerata un marker del livello di contaminazione.

La presenza di tessuti a diversa capacità di bioaccumulo dei metalli pesanti in *Procambarus clarkii* rende tali organismi specie target attraverso una valutazione del rapporto tra le concentrazioni nei tessuti di detossificazione (epatopancreas) e quelle nei tessuti non detossificanti (muscolatura addominale). Questo rapporto può essere considerato un marker del livello di stress da contaminazione.

Altri approcci hanno consentito di analizzare l'effetto dei metalli pesanti sulla comunità di macroinvertebrati, rappresentando metodiche a basso costo per la valutazione dello stato di salute di un ecosistema fluviale.

L'analisi dei tratti funzionali dei macroinvertebrati ha permesso di delineare il livello di inquinamento, inclusa la contaminazione da metalli pesanti. Pertanto, i tratti bio-ecologici svolgono un ruolo rilevante nella biovalutazione di un ecosistema lotico stressato, evidenziando anche gli effetti dei contaminanti a basse concentrazioni che tendono a rimanere elusivi.

Le *Self-Organizing Map* sono risultate validi strumenti per saggiare come i gradienti dell'inquinamento (in particolare da metalli pesanti) tendano a presentare modelli congruenti con i modelli spaziali e temporali delle comunità di macroinvertebrati. La visualizzazione di schemi spaziali ha fornito modelli espliciti nei confronti dei quali viene valutata la deviazione da una condizione di riferimento.

L'elaborazione di un indice multimettrico capace di rispondere all'inquinamento (compreso quello da metalli pesanti) consente di disporre di un ulteriore e nuovo strumento per il biomonitoraggio dei corsi d'acqua di piccola-media dimensione. L'indice è stato progettato per essere sensibile ai diversi tipi di inquinamento (indice generalista) e soddisfa i requisiti della *Water Framework Directive* dell'Unione Europea (WFD).

In sintesi, il presente studio ha messo in atto diversi approcci metodologici volti a definire gli effetti della contaminazione da metalli pesanti nei sedimenti fluviali mediante una valutazione della risposta biologica degli organismi macroinvertebrati, con l'intento di elaborare e definire utili strumenti d'analisi per decisioni gestionali mirate alla salvaguardia o al recupero ambientale.

## CONCLUSIONS

Les résultats des travaux menés sur la contamination par les métaux lourds dans les sédiments des cours d'eau au travers de l'espèce bioindicatrice *Chironomus riparius* confirme que les malformations morphologiques représentent un critère valable pour l'évaluation des effets toxiques sur le biota. La fréquence des larves malformées peut être considérée comme un marqueur du degré de contamination des écosystèmes. La présence de différents tissus bioaccumulateurs des métaux lourds chez l'Écrevisse de Louisiane rend cette espèce pertinente pour une évaluation des niveaux de stress via le rapport des concentrations dans l'hépatopancréas et les muscles abdominaux.

Des approches basées sur les communautés de macroinvertébrés représentent des méthodes peu coûteuses pour l'évaluation de la santé d'un écosystème fluvial. L'analyse des traits fonctionnels des macroinvertébrés nous a permis de caractériser les niveaux de dégradation écologique, y compris sous l'effet de la contamination par les métaux lourds. Par conséquent, les traits bio-écologiques peuvent jouer un rôle important dans la bioindication des écosystèmes lotiques, en mettant en évidence les effets des contaminants dès les plus faibles concentrations, alors que ces effets restent difficilement décelables par des analyses physico-chimiques. Les patrons d'organisation des communautés sont congruents avec les gradients de pollution, en particulier la pollution aux métaux lourds. Les modèles spatio-temporels dégagés nous ont alors permis de caractériser des conditions de référence. L'indice mutlimétrique qui mesure l'écart à la référence répond aux pollutions (y compris aux métaux lourds), constituant un outil efficace pour la surveillance environnementale à l'échelle du bassin versant, tout en appliquant les recommandations de la DCE.

En résumé, nos travaux exploré diverses approches méthodologiques pour déterminer les effets de la contamination par des métaux lourds des cours d'eau par une évaluation des réponses biologiques des macroinvertébrés à divers niveaux d'organisation, dans l'intention de développer

des outils d'analyse utiles pour les décisions de gestion visant à la conservation et/ou la restauration de l'environnement.





## BIBLIOGRAFIA

- Abbas, F.M.A., Anees, A., Norli, I., Mat, E.A., 2008. Multivariate analysis of heavy metals concentrations in river estuary. *Environmental Monitoring Assessment*. 143, 179-186.
- Admiraal, W., Barranguet, C., Van Beusekom, S.A.M., Bleeker, E.A.J., Van den Ende, F.P., Van der Geest, H.G., Groenendijk, D., Ivorra, N., Kraak, M.H.S., Stuijzand, S.C., 2000. Linking ecological and ecotoxicological techniques to support river rehabilitation. *Chemosphere*. 41, 289-295.
- Alba-Tercedor, J., et al., 2002. Caracterizaciòn de cuencas mediterraneas espan olas en base al indice espan ol SBMWP como paso previo al estabilicimiento del estado ecològico de sus cursos de agua. XI Congreso de la Associaciòn Espan olas de Limnologia y III Congreso Ibérico de Limnologia, Madrid 17-21 giugno.
- Alcorlo, P., Otero, M., Crehuet, M., Baltanás, A., Montes, C., 2006. The use of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*, Girard) as indicator of the bioavailability of heavy metals in environmental monitoring in the River Guadiana (SW, Spain). *Science of the Total Environment*. 366, 380-390.
- Allen, H.E., Hansen, D.J., 1996. The importance of trace metal speciation to water quality criteria. *Water Environment Research*. 68, 42-54.
- Anderson, M.B., Reddy, P., Preslan, J.E., Fingerman, M., Bollinger, J.E., Jolibois, L., Maheshwarudu, G., George, W.J., 1997. Metal accumulation in crayfish, *Procambarus clarkii*, exposed to a petroleum-contaminated bayou in Louisiana. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 37, 267-272.
- Archaimbault, V., Usseglio-Polatera, P., Garric, J., Wasson, J.G., Babut, M., 2010. Assessing pollution of toxic sediment in streams using bio-ecological traits of benthic macroinvertebrates. *Freshwater Biology*. 55, 1430-1446.
- Armitage, P.D., Moss, D., Wright, J.F., Furse, M.T., 1983. The performance of a new biological water quality score system based on macroinvertebrates over a wide range of unpolluted running-water sites. *Water Research*. 17, 333-347.

- Arnason, J.G., Fletcher, B.A., 2003. A 40-year record of Cd, Hg, Pb and U deposition in sediments of Patroon Reservoir, Albany County, NY, USA. *Environmental Pollution*. 123,383-391.
- Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale (ARPA) Umbria, 2010. Bacino idrografico del Fiume Nestore - Monitoraggio chimico e microbiologico di acque e scarichi - Relazione tecnica.
- Aurada, K.D. 1983. Physiographic and anthropogenic controls of global and regional ionic runoff, In: Webb, B.W. (Ed.), Dissolved Loads of Rivers and Surface Water Quantity/Quality Relationship, Proc. Symp., Hamburg, IAHS Publ. 141, 31-39.
- Bailey, R.C., Norris, R.H., Reynoldson, T.B., 2001. Taxonomic resolution of benthic macroinvertebrate communities in bioassessments. *Journal of the North American Benthological Society*. 20, 280-286
- Bailey, R.C., Norris, R.H., Reynoldson, T.B., 2003. Bioassessment of freshwater ecosystems using the reference condition approach. Kluwer Academic Publishers, New York.
- Baptista, D.F., Buss, D.F., Egler, M., Giovanelli, A., Silveria, M.P., Nessimian, J.L., 2007. A multimetric index based on benthic macroinvertebrates for evaluation of Atlantic Forest streams at Rio de Janeiro State, Brazil. *Hydrobiologia*. 575, 83-94.
- Barbour, M. T., Gerristen, J., Snyder, B. D., Stribling, J. B., 1999. Rapid bioassessment protocols for use in streams and wadeable rivers: periphyton, benthic macroinvertebrates and fish. 2nd edn. U.S. EPA. Office of Water, Washington D.C.
- Bêche, L. A., McElravy, E. P., Resh, V. H., 2006. Long-term seasonal variation in the biological traits of benthic macroinvertebrates in two Mediterranean climate streams in California, USA. *Freshwater Biology*. 51, 56-75.
- Belfiore, C., 1983. Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane. Efemerotteri (Ephemeroptera). C.N.R. AQ/1/201.
- Bervoets, L., Blust, R., De Wit, M., Verheyen, R., 1997. Relations of river sediment characteristics to trace metal concentrations in oligochaetes and chironomids. *Environmental Pollution*. 95, 345-356.

- Besser, J.M., Brumbaugh, W.G., Ivey, C.D., Ingersoll, C.G., Moran, P.W., 2008. Biological and chemical characterization of metal bioavailability in sediments from Lake Roosevelt, Columbia River, Washington, USA. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 54, 557-570.
- Bird, G.A., 1994. Use of chironomid deformities to assess environmental degradation in the Yamaska River, Quebec. *Environmental Monitoring and Assessment*. 30, 163-175.
- Bird, G.A., Schwartz, W.J., Joseph, D.L., 1995. The effect of  $^{210}\text{Pb}$  and stable lead on the induction of *menta* deformities in *Chironomus tentans* larvae and on their growth and survival. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 14, 2125-2130.
- Birk S., Bonne, W., Borja, A., Brucet, S., Courrat, A., Poikane, S., Solimini, A., Van de Bund, W., Zampoukas, N., Hering, D., 2012. Three hundred ways to assess Europe's surface waters: An almost complete overview of biological methods to implement the Water Framework Directive. *Ecological Indicators*. 18, 31-41.
- Böhmer, J., Rawer-Jost, C., Zenker, A., Meier, C., Feld, C.K., Biss, R., Hering, D., 2004. Assessing streams in Germany with benthic invertebrates: Development of a multimetric invertebrate based assessment system. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters*. 34, 416-432.
- Bollinger, J.E., Bundy, K., Anderson, M.B., Millet, L., Preslan, J.E., Jolibois, L., Chen, H.S., Kamath, B., George, W.J., 1997. Bioaccumulation of chromium in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Journal of Hazardous Materials*. 54, 1-13.
- Bonada N., Prat, N., Resh, V. H., Statzner, B., 2006. Developments in aquatic insect biomonitoring: a comparative analysis of recent approaches. *Annual Review of Entomology*. 51, 495-523.
- Bonada, N., Rieradevall, M., Prat, N., 2007a. Macroinvertebrate community structure and biological traits related to flow permanence in a Mediterranean river network. *Hydrobiologia*. 589, 91-106.
- Bonada, N., Dolédec, S., Statzner, B., 2007b. Taxonomic and biological trait differences of stream macroinvertebrate communities between mediterranean and temperate regions: implications for future climatic scenarios. *Global Change Biology*. 13, 1658-1671.

- Cairns, M.A., Nebeker, A.V., Gakstater, J.H., Griffis, W.L., 1984. Toxicity of copper-spiked sediments to freshwater invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 3, 435-445.
- Calabrese, E.J., 1991. Multiple Chemical Interactions. Lewis Publishers, Chelsea, Mi., USA. p.13.
- Calamari, D., Alabaster, J.S., 1980. An approach to theoretical models in evaluating the effects of mixtures of toxicants in the aquatic environment. *Chemosphere*. 9, 533-538.
- Campaioli, S., Ghetti, P.F., Minelli, A., Ruffo, S., 1999. Manuale per il riconoscimento dei macroinvertebrati delle acque dolci italiane. Provincia Autonoma di Trento.
- Canfield, T.J., Kemble, N.E., Brumbaugh, W.G., Dwyer, F.J., Ingersoll, C.G., Fairchild, J.F., 1994. Use of benthic invertebrate community structure and the sediment quality triad to evaluate metal-contaminated sediment in the upper Clark Fork River, Montana. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 13, 1999-2012.
- Carchini, G., 1983. Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane. Odonati (Odonata). C.N.R. AQ/1/198.
- Céréghino, R., Lavandier, P., 1998. Influence of hydropeaking on the distribution and larval development of the Plecoptera from a mountain stream. *Regulated Rivers: Research & Management*. 14, 297-309.
- Céréghino, R., Park, Y. S., Compin, A., Lek, S., 2003. Predicting the species richness of aquatic insects in streams using a limited number of environmental variables. *Journal of The North American Benthological Society*. 22, 442-456.
- Céréghino, R., Park, Y.S., 2009. Review of the Self-Organizing Map (SOM) approach in water resources: Commentary. *Environmental Modelling & Software*. 24, 945-947.
- Céréghino, R., Oertli, B., Bazzanti, M., Coccia, C., Compin, A., Biggs, J., Bressi, N., Grillas, P., Hull, A., Kalettka, T., Scher, O., 2012. Biological traits of European pond macroinvertebrates. *Hydrobiologia*. 689, 51-61.
- Chao, A., 1984. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*. 11, 265-270.

- Chapman, P.M., 1989. Current approaches to developing sediment quality criteria. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 8, 589-599.
- Chapman, P.M., 1990. The sediment quality triad approach to determining pollution-induced degradation. *Science of the Total Environment*. 97/98, 815-825.
- Chaves, M.L., Costa, J.L., Chainho, P., Costa, M.J., Prat, N., 2011. Are Water Framework Directive stream types biologically relevant? The case of the Mondego river, Portugal. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*. 47, 119-131.
- Chevenet, F., Dolédec, S., Chessel, D., 1994. A fuzzy coding approach for the analysis of long-term ecological data. *Freshwater Biology*. 31, 295-309.
- Colwell, R.K., Coddington, J.A., 1994. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 345, 101-118.
- Compin, A., Céréghino, R., 2007. Spatial patterns of macroinvertebrate functional feeding groups in streams in relation to physical variables and land-cover in Southwestern France. *Landscape Ecology*. 22, 1215-1225.
- Connon, R.E., Geist, J., Werner, I., 2012. Effect-Based Tools for Monitoring and Predicting the Ecotoxicological Effects of Chemicals in the Aquatic Environment. *Sensors*. 12, 12741-12771.
- Consiglio, C., 1980. Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane. Plecotteri (Plecoptera). C.N.R. AQ/1/77. 68.
- Cottrill, B.R., 2003. The scope for reducing trace element supplementation of livestock diet. Atti del workshop "Assessment and reduction of heavy metal inputs into agro-ecosystems", concerted action Aromis.
- Couceiro, S.R.M., Hamada, N., Forsberg, B.R., Pimentel, T.P., Luz, S.L.B., 2012. A macroinvertebrate multimetric index to evaluate the biological condition of streams in the Central Amazon region of Brazil. *Ecological Indicators*. 18, 118-125.
- Council of the European Communities (2000) Directive of the European Parliament and of the Council Establishing a Framework for Community Action in the Field of Water Policy (2000 / 60 / EC). *Official Journal of the European Community*. 43, 1-73.

- Cummins, K. W., Wilzbach, M. A., 1985. Field procedures for the analysis of functional feeding groups in stream ecosystems. Appalachian Environmental Laboratory. Contribution No. 1611, University of Maryland, Frostburg, MD.
- Davutluoglu, O.I., Seckin, G., Ersu, C.B., Ylmaz, T., Sari, B., 2011. Heavy metal content and distribution in surface sediments of the Seyhan River, Turkey. *Journal of Environmental Management*. 92, 2250-2259.
- De Haas, E.M., Léon Paumen, M., Koelmans, A.A., Kraak, M.H.S., 2004. Combined effects of copper and food on the midge *Chironomus riparius* in whole sediment bioassays. *Environmental Pollution*. 127, 99-107.
- De Jonge, M., Van de Vijver, B., Blust, R., Bervoets, L., 2008. Responses of aquatic organisms to metal pollution in a lowland river in Flanders: a comparison of diatoms and macroinvertebrates. *Science of the Total Environment*. 407, 615-629.
- De Souza, C.M.M., Pestana, M.H.D., Drude de Lacerda, L., 1986. Geochemical partitioning of heavy metals in sediments of three estuaries along the coastal of Rio de Janeiro (Brazil). *Science of the Total Environment*. 58, 63-72.
- Desrosiers, M., Gagnon, C., Masson, S., Martel, L., Babut, M.P., 2008. Relationships among total recoverable and reactive metals and metalloid in St. Lawrence River sediment: bioaccumulation by chironomids and implications for ecological risk assessment. *Science of the Total Environment*. 389, 101-114.
- Devesa, V., Súañer, M.A., Lai, V.W.M., Granchinho, S.C.R., Martínez, J.M., Vélez, D., Cullen, W.R., Montoro, R., 2002. Determination of arsenic species in a freshwater crustacean *Procambarus clarkii*. *Applied Organometallic Chemistry*. 16, 123-132.
- Devi, M., Thomas, D.A., Barber, J.T., Fingerman, M., 1996. Accumulation and physiological and biochemical effects of cadmium in a simple aquatic food chain. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 33, 38-43.
- Di Veroli, A., Selvaggi, R., Pellegrino, R.M., Goretti, E., 2010. Sediment toxicity and deformities of chironomid larvae in Lake Piediluco (Central Italy). *Chemosphere*. 79, 33-39.

- Di Veroli, A., Selvaggi, R., Goretti, E., 2012a. Chironomid mouthpart deformities as indicator of environmental quality: a case study in Lake Trasimeno (Italy). *Journal of Environmental Monitoring*. 14, 1473-1478.
- Di Veroli, A., Goretti, E., Paumen, M.L., Kraak, M.H.S., Admiraal, W., 2012b. Mouthpart deformities in *Chironomus riparius* larvae exposed to toxicants. *Environmental Pollution*. 166, 212-217.
- Di Veroli, A., Santoro, F., Pallottini, M., Selvaggi, R., Scardazza, F., Cappelletti, D. Goretti, E., 2014. Deformities of chironomid larvae and heavy metal pollution: from laboratory to field studies. *Chemosphere*. 112, 9-17.
- Diaz, A. M., Suarez Alonso, M. L., Vidal-Abarca Gutierrez, M. R., 2008. Biological traits of stream macroinvertebrates from a semi-arid catchment: patterns along complex environmental gradients. *Freshwater Biology*. 53, 1-21.
- Dodson, S.I., Arnott, S.E., Cottingham, K.L., 2000. The relationship in lake communities between primary productivity and species richness. *Ecology*. 81, 2662-2679.
- Dolédec, S., Chessel, D., 1994. Co-inertia analysis: an alternative method for studying species-environment relationships. *Freshwater Biology*. 31, 277-294.
- Dolédec S., Statzner, B., Frainay, V., 1998. Accurate description of functional community structure: identifying stream invertebrates to species-level? *Bulletin of the North American Benthological Society*. 15, 154-155.
- Dolédec, S., Phillips, N., Scarsbrook, M. R., Riley, R. H., 2006. Comparison of structural and functional approaches to determining land use effects on grassland stream invertebrate communities. *Journal of the North American Benthological Society*. 25, 44-60.
- Dolédec, S., Statzner, B., 2008. Invertebrate traits for the biomonitoring of large European rivers: an assessment of specific types of human impact. *Freshwater Biology*. 53, 617-634.
- Dolédec, S., Statzner, B., 2010. Responses of freshwater biota to human disturbances: contribution of J-NABS to developments in ecological integrity assessments. *Journal of the North American Benthological Society*. 29, 286-311.



- Dörr, A.J.M., Pedicillo, G., Lorenzoni, M., 2001. Prima segnalazione di *Procambarus clarkii*, *Orconectes limosus* e *Astacus leptodactylus* (Crustacea Decapoda) in Umbria. *Rivista di Idrobiologia*. 40, 221-233.
- Dörr, A.J.M., La Porta, G., Pedicillo, G., Lorenzoni, M., 2006. Biology of *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) in Lake Trasimeno. *Bulletin Francais de la Peche et de la Pisciculture*. 380-381, 1155-1168.
- Dray, S., Chessel, D., Thioulouse, J., 2003. Co-inertia analysis and the linking of ecological data tables. *Ecology*. 84, 3078-3089.
- Duffus, J.H., 2002. Heavy metals - A meaningless term? IUPAC technical report. *Pure and Applied Chemistry*. 74, 793-807.
- Eckel, H., Mantovi, P., Roth, U., 2003. Options for heavy metal input reduction. Atti del workshop "Assessment and reduction of heavy metal inputs into agroecosystems", concerted action Aromis.
- El-Shaikh, K., Nada, A.S., Yousief, Z.A., 2005. Assessment of cadmium and lead in water, sediment and different organs of *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) in the River Nile. *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences*. 15, 161-167.
- Estebe, A., Boudries, H., Mouchel, J., Thevenot, D.R., 1997. Urban runoff impacts on particulate metal and hydrocarbon concentrations in River Seine: Suspended solid and sediment transport. *Water Science and Technology*. 36, 185-193.
- European Environment Agency (EEA), 1999. State and pressures of the marine and coastal Mediterranean environment. Copenhagen.
- Fabrizi, A., Goretti, E., Compin, A., Céréghino, R., 2010. Influence of fish farming on the spatial patterns and biological traits of river invertebrates in an Apennine stream system (Italy). *International Review of Hydrobiology*. 95, 410-427.
- Faria, M.S., Lopes, R.J., Malcato, J., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M., 2008. In situ bioassays with *Chironomus riparius* larvae to biomonitor metal pollution in rivers and to evaluate the efficiency of restoration measures in mine areas. *Environmental Pollution*. 151, 213-221.

- Filgueiras, A.V., Lavilla, I., Bendicho, C., 2002. Chemical sequential extraction for metal partitioning in environmental solid samples. *Journal of Environmental Monitoring*. 4, 823-857.
- Friberg, N., Bonada, N., Bradley, D.C., Dunbar, M. J., Edwards, F.K., Grey, J., Hayes, R.B., Hildrew A.G., Lamouroux, N., Trimmer, M., Woodward, G., 2011. Biomonitoring of Human Impacts in Freshwater Ecosystems: The Good, the Bad and the Ugly. *Advances in Ecological Research*. 44, 1-68
- Gabriels, W., Lock, K., Pauw, N.D., Goethals, P.L., 2010. Multimetric Macroinvertebrate Index Flanders (MMIF) for biological assessment of rivers and lakes in Flanders (Belgium). *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters*. 40, 199-207.
- Garrels, R.M., Mackenzie, F.T., Hunt, C., 1975. Chemical Cycles and the Global Environment - Assessing Human Influences. W. Kaufman, Inc., Los Altos, California, pp.206.
- Gayraud, S., Statzner, B., Bady, P., Haybachp, A., Scholl, F., Usseglio-Polatera, P., Bacchi, M., 2003. Invertebrate traits for the biomonitoring of large European rivers: an initial assessment of alternative metrics. *Freshwater Biology*. 48, 2045-2064.
- Gherardi, F., Baldaccini, G.N., Ercolini, P., Barbaresi, S., De Luise, G., Mazzoni, D., Mori, M., 1999. The situation in Italy. *Crustacean Issues*. 11, 107-128.
- Ghetti, P.F., Bonazzi, G., 1981. I macroinvertebrati nella sorveglianza ecologica dei corsi d'acqua. Collana del Progetto Finalizzato Promozione della qualità dell'ambiente. C.N.R. AQ/1/127.
- Ghetti, P.F., 1997. Manuale di Applicazione: Indice Biotico Esteso - I macroinvertebrati nel controllo della qualità degli ambienti di acque correnti. Provincia Autonoma di Trento, Servizio Protezione Ambiente.
- Gibbs, R.J., 1977. Transport phases of transition metals in the Amazon and Yukon rivers. *Geological Society of America Bulletin*. 88, 829-843.
- Giesy, J.P., Graney, R.L., Newsted, J.L., Cornell, J.R., Benda, A., Kreis, R.G.J., Horvath, F.J., 1988. Comparison of three sediment bioassays methods using Detroit river sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 7, 483-498.
- Giesy, J.P., Hoke, R.A., 1989. Freshwater sediment toxicity bioassessment: rationale for species selection and test design. *Journal of Great Lakes Research*. 15, 539-569.

- Giraudel, J.L., Lek, S., 2001. A comparison of self-organizing map algorithm and some conventional statistical methods for ecological community ordination. *Ecological Modelling*. 146, 329-339.
- Gómez-Gutiérrez, A.I., Jover, E., Bodineau, L., Albaigés, J., Bayona, J.M., 2006. Organic contaminant loads into the Western Mediterranean Sea: Estimate of Ebro River inputs. *Chemosphere*. 65, 224-236.
- Gómez-Gutiérrez, A., Garnacho, E., Bayona, J.M., Albaigés, J., 2007. Screening ecological risk assessment of persistent organic pollutants in Mediterranean sea sediments. *Environment International*. 33, 867-876.
- Gotelli, N.J., McCabe, D.J., 2002. Species co-occurrence: a meta-analysis of J.M. Diamond's assembly rules model. *Ecology*. 83, 2091-2096.
- Graney, J.R., Eriksen, T.M., 2004. Metals in pond sediments as archives of anthropogenic activities: a study in response to health concerns. *Applied Geochemistry*. 19, 1177-1188.
- Gutiérrez-Yurrita, P., Montes, C., 1999. Bioenergetics and phenology of reproduction of the introduced red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, in Doñana National Park, Spain, and implications for species management. *Freshwater Biology*. 42, 561-574.
- Hamilton, A.L., Saether, O.A., 1971. The occurrence of characteristic deformities in the chironomid larvae of several Canadian lakes. *The Canadian Entomologist*. 103, 363-368.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. 4, 1-9.
- Hare, L., Tessier, A., 1998. The aquatic insect *Chaoborus* as a biomonitor of trace metals in lakes. *Limnology and Oceanography*. 43, 1850-1859.
- Hasburgo-Lorena, A.S., 1986. The status of the *Procambarus clarkii* population in Spain. *Freshwater Crayfish*. 6, 131-136.
- Hering, D., Feld, C.K., Moog, O., Ofenböck, T., 2006. Cook book for the development of a multimetric index for biological condition of aquatic ecosystems: Experiences from the European AQEM and STAR projects and related initiatives. *Hydrobiologia*. 566, 311-324.

- Hering, D., Borja, A., Carstensen, J., Carvalho, L., Elliott, M., Feld, C.K., Heiskanen, A-S., Johnson, R.K., Moe, J., Pont, D., Solheim, A.L., van de Bund, W., 2010. The European Water Framework Directive at the age of 10: A critical review of the achievements with recommendations for the future. *Science of The Total Environment* 408, 4007-4019.
- Hernberg, S., 2000. Lead Poisoning in a Historical Perspective. *American Journal Of Industrial Medicine*. 38, 244-254.
- Hickey, C.W., Clements, W.H., 1998. Effects of heavy metals on benthic macroinvertebrate communities in New Zealand streams. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 17, 2338-2346.
- Hobbs, H.H., Jess, J.P., Huner, J.V., 1989. A review of global crayfish introductions with particular emphasis on two North American species (Decapoda, Cambaridae). *Crustaceana*. 56, 299-316.
- Holt, M.S., 2000. Sources of chemical contaminants and routes into the freshwater environment. *Food and Chemical Toxicology*. 38, 21-27.
- Hsu, M.J., Selvaraj, K., Agoramoorthy, G., 2006. Taiwan's industrial heavy metal pollution threatens terrestrial biota. *Environmental Pollution*. 143, 327-334.
- Huner, J.V., 1994. Ecological observations of red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard, 1852), and white river crayfish, *Procambarus zonangulus* (Hobbs and Hobbs 1990), as regards their cultivation in earthen ponds. *Freshwater Crayfish*. 10, 456-468.
- Huner, J.V., Barr, J.E., 1991. Red swamp crayfish: Biology and exploitation. Louisiana Sea Grant College Program, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana (USA).
- Icely, J.D., Nott, J.A., 1992. Digestion and absorption: digestive systems and associated organisms. In: Harrison FW, Humes AG, editors. Microscopic anatomy of invertebrates, vol. 10. Decapod crustacea. New York: Wiley-Liss, Inc. p. 147-201.
- Ingrao, G., Santaroni, G., Tomassi, G., 1995. Elementi in traccia: ruolo biologico e aspetti nutrizionali per l'uomo. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*. 31, 275-281.
- Iserentant, R., De Sloover, J., 1976. Le concept de bioindicateur. *Memoires de la Societe Royale Botanique de Belgique*. 7, 15-24.

- Jain, C.K., Sharma, M.K., 2001. Distribution of trace metals in the Hindon River system, India. *Journal of Hydrology*. 253, 81-90.
- Jain, C.K., Sharma, M.K., 2006. Heavy metal transport in the Hindon River basin, India. *Environmental Monitoring and Assessment*. 112, 255-270.
- Janssens de Bisthoven, L.G., Nuyts, P., Goddeeris, B., Ollevier, F., 1998. Sublethal parameters in morphologically deformed *Chironomus* larvae: clues to understand their bioindicator value. *Freshwater Biology*. 39, 179-191.
- Janssens De Bisthoven, L., Postma, J., Vermeulen, A., Goemans, G., Ollevier, F., 2001. Morphological deformities in *Chironomus riparius* Meigen larvae after exposure to cadmium over several generations. *Water, Air, & Soil Pollution*. 129, 167-179.
- Järup, L., 2003. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*. 68, 167-182.
- Johnson, R.K., Wiederholm, T., Rosenberg, D.M., 1992. Freshwater biomonitoring using individual organism, population and species assemblages of benthic macroinvertebrates. In: Rosenberg D. M. e Resh V.H. (Ed). *Freshwater and benthic macroinvertebrates*. New York. Chapman and Hall; pp. 41-104.
- Kalteh, A.M., Hjorth, P., Berndtsson, R., 2008. Review of the self-organizing map (SOM) approach in water resources: Analysis, modelling and application. *Environmental Modelling & Software*. 23, 835-845.
- Karr, J.R., 1981. Assessment of biotic integrity using fish communities. *Fisheries*. 6, 21-27.
- Karr, J.R., Chu, E.W., 1999. *Restoring life in Running Waters: Better Biological Monitoring*. Island Press, Washington, DC.
- Kelly, F.L., Harrison, A.J., Allen, M., Connor, L., Rosell, R., 2012. Development and application of an ecological classification tool for fish in lakes in Ireland. *Ecological Indicators*. 18, 608-619.
- Khan, A.T., Forester, D.M., Mileke, H.W., 1995. Heavy metal concentrations in two populations of crayfish. *Veterinary and Human Toxicology*. 37, 426-428.
- Klavinš, M., Briede, A., Rodinov, V., Kokorite, I., Parele, E., Klavina, I., 2000. Heavy metals in rivers of Latvia. *Science of The Total Environment*. 262, 175-183.

- Kohonen, T., 1991. Self-organizing maps: optimization approaches. Proceedings of ICANN'91, International Conference on Artificial Neural Networks, volume II. North-Holland, Amsterdam. pp 981-990.
- Kohonen, T., 2001. Self-Organizing Maps, Third edition. Berlin, Germany: Springer.
- Kosawalt, P., Knight, A.W., 1987. Chronic toxicity of copper to a partial life cycle of the midge, *Chironomus decorus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 16, 283-290.
- Kreuger, J., 1998. Pesticides in stream water within an agricultural catchment in southern Sweden, 1990-1996. *Science of the Total Environment*. 216, 227-251.
- Lacerda, L.D., Fernandez, M.A., Calazans, C.F., Tanizaki, K.F., 1992. Bioavailability of heavy metals in sediments of two coastal lagoons in Rio de Janeiro, Brazil. *Hydrobiologia*. 228, 65-70.
- Lek, S., Guégan, J., 2000. Artificial Neuronal Networks: Application to Ecology and Evolution. Berlin, Germany: Springer.
- León Paumen, M., Borgman, E., Kraak, M.H.S., Van Gestel, C.A.M., Admiraal, W., 2008. Life cycle responses of the midge *Chironomus riparius* to polycyclic aromatic compound exposure. *Environmental Pollution*. 152, 225-232.
- Li, Y. L., Liu, J. L., Cao, Z. G., Lin, C., Yang, Z. F., 2010. Spatial distribution and health risk of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) in the water of Luanhe River Basin, China. *Environmental Monitoring and Assessment*. 163, 1-13.
- Liess, M., Schäfer, R. B., Schriever, C. A., 2008. The footprint of pesticide stress in communities—species traits reveal community effects of toxicants. *Science of the Total Environment*. 406, 484-490.
- Liess, M., Beketov, M., 2011. Traits and stress: keys to identify community effects of low levels of toxicants in test systems. *Ecotoxicology*. 20, 1328-1340.
- Lindqvist, O.V., Huner, J.V., 1999. Life history characteristics of crayfish: what makes some of them good colonizers? *Crustacean Issues*. 11, 23-30.
- Liu, J., Li, Y., Zhang, B., Cao, J., Cao, Z., Domagalski, J., 2009. Ecological risk of heavy metals in sediments of the Luan River source water. *Ecotoxicology* 18, 748-758.

- Lorenzoni, M., Corboli, M., Grillo, E., Pedicillo, G., Carosi, A., Viali, P., Ghetti, L., Baldini, G., Zeetti, A., Natali, M., Dolciemi, R., Biscaro Parrini, A., Mezzetti, A., Mossone, M., Andreani, M., Burchia, A., Cassieri, S., De Luca, M., Quondam Luigi, S., Uzzoli, C., Di Brizio, M., 2004. La carta ittica della regione Umbria: bacino del Fiume Nestore. Regione Umbria, Perugia.
- Luoma, S.N., 1983. Bioavailability of trace metals to aquatic organisms - a review. *Science of the Total Environment*. 28, 1-22.
- Mac Donald, D.D., Ingersoll, C.G., Berger, T.A., 2000. Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 39, 20-31.
- Madden, C.P., Suter, P.J., Nicholson, B.C., Austin, A.D., 1992. Deformities in chironomid larvae as indicators of pollution (pesticide) stress. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology*. 26, 551-557.
- Madden, C.P., Austin, A.D., Sutter, P.J., 1995. Pollution monitoring using chironomidi larvae: what is a deformity? In: Craston, P. (Ed.), *Chironomids from Genes to Ecosystems*. CSRIO Publication, East Melbourne, pp. 89-94.
- Madigosky, S.R., Álvarez-Hernández, X., Glass, J., 1991. Lead, cadmium and aluminum accumulation in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* G. collected from roadside drainage ditches in Louisiana. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 20, 253-258.
- Mäenpää, K.A., Sormunen, A.J., Kukkonen, J.V.K., 2003. Bioaccumulation and toxicity of sediment associated herbicides (ioxynyl, pendimethalin, and bentazone) in *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta) and *Chironomus riparius* (Insecta). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 56, 398-410.
- Mantovi, P., Bonazzi, G., 2004. Riduzione del tenore di rame e zinco nei mangimi. *L'Informatore Agrario*. 4, 61-64.
- Marking, L.L., 1985. Toxicity of chemical mixtures. In: Rand, G.M., Petrocelli, S.R.(Eds.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Publishing Corporation, New York, pp. 164-176.

- Martín-Díaz, M.L., Tuberty, S.R., Mckenney Jr C.L., Blasco, J., Sarasquete, C., Delvals, T.A., 2006. The use of bioaccumulation, biomarkers and histopathology diseases in *Procambarus clarkii* to establish bioavailability of Cd and Zn after a mining spill. *Environmental Monitoring and Assessment*. 16, 169-184.
- Martinez, E.A., Moore, B.C., Schaumloffel, J., Dasgupta, N., 2002. The potential association between *menta* deformities and trace elements in Chironomidae (Diptera) taken from a heavy metal contaminated river. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 42, 286-291.
- Martinez, E.A., Moore, B.C., Schaumloffel, J., Dasgupta, N., 2003. Morphological abnormalities in *Chironomus tentans* exposed to cadmium and copper-spiked sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 55, 204-212.
- Maul, J.D., Belden, J.B., Schwab, B.A., Whiles, M.R., Spears, B., Farris, J.L., Lydy, M.J., 2006. Bioaccumulation and trophic transfer of polychlorinated biphenyls by aquatic and terrestrial insects to tree swallows (*Tachycineta bicolor*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 25, 1017-1025.
- Mearelli, M., Lorenzoni, M., Carosi, A., Petesse, M. L., Giovinazzo, G., Cingolani, L., Ghetti, L., Montilli, G., Mossone, M., Nelli, P., Uzzoli, C., 1996. Carta Ittica della Regione Umbria: bacino del F. Nestore. Regione Umbria, Perugia.
- Merritt, R. W., Cummins, K. W., 1978. An Introduction to the Aquatic Insects of North America. Kendall/Hunt Publ. Co., Dubuque, IA.
- Michailova, P., Belcheva, R., 1990. Different effect of lead on external morphology and polytene chromosomes of *Glyptotendipes barbipes* (Staeger) (Diptera, Chironomidae). *Folia Biologica (Krakow)*. 38, 83-88.
- Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio (MATT), Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i servizi Tecnici (APAT), 2005. Progetto nazionale di monitoraggio acque superficiali (IRSA, CNR). Gli ecosistemi e i sedimenti: Caratterizzazione dei sedimenti. Linee guida, protocolli operativi, attività sperimentali. Progetto nazionale di monitoraggio delle acque superficiali (IRSA, CNR).



- Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare (MATTM), 2010. Decreto 8 novembre, 2010 n. 260. Regolamento recante i criteri tecnici per la classificazione dello stato dei corpi idrici superficiali, per la modifica delle norme tecniche del decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152, recante norme in materia ambientale, predisposto ai sensi dell'articolo 75, comma 3, del medesimo decreto legislativo.
- Minshall, G. W., 1988. Stream ecosystem theory: a global perspective. *Journal of the North American Benthological Society*. 7, 263-288.
- Miserendino, M.L., Masi, C.I., 2010. The effect of land use on environmental features and functional organization of macroinvertebrate communities in Patagonian low order streams. *Ecological Indicators*. 10, 311-319.
- Mondy, C.P., Villeneuve, B., Archaimbault, V., Usseglio-Polatera, P., 2012. A new macroinvertebrate-based multimetric index (I2M2) to evaluate ecological quality of French wadeable streams fulfilling the WFD demands: A taxonomical and trait approach. *Ecological Indicators*. 18, 452-467.
- Moore, A.A., Palmer, M.A., 2005. Invertebrate biodiversity in agricultural and urban headwater streams: implications for conservation and management. *Ecological Applications*. 15, 1169-1177.
- Moretti, 1983. Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane. Tricotteri (Thricoptera). C.N.R. AQ/1/196.
- Moya, N., Tomanova, S., Oberdorff, T., 2007. Initial development of a multi-metric index based on aquatic macroinvertebrates to assess streams condition in the Upper Isiboro-Secure Basin, Bolivian Amazon. *Hydrobiologia*. 589, 107-116.
- Nahmani, J., Rossi, J.P., 2003. Soil macroinvertebrates as indicators of pollution by heavy metals. *Comptes Rendus Biologies*. 326, 295-303.
- Naimo, T.J., 1995. A review of the effects of heavy-metals on freshwater mussels. *Ecotoxicology*. 4, 341-362.
- Naqvi, S.M., Howell, R.D., 1993. Cadmium and Lead Uptake by Red Swamp Crayfish (*Procambarus clarkii*) of Louisiana. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 51, 296-302.

- Nielsen, F.H., 2000. Evolutionary events culminating in specific minerals becoming essential for life. *European Journal of Nutrition*. 39, 62-66.
- Niemi, G. J., McDonald, M. E., 2004. Application of ecological indicators. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 35, 89-111.
- Novotny, V., 1999. Diffuse pollution from agriculture - A worldwide outlook. *Water Science and Technology*. 39, 1-13.
- OECD, 2004. Guideline 21: Sediment-water Toxicity Test Using Spiked Sediment. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- Oertli, B., 1993. Leaf litter processing and energy flow through macroinvertebrates in a woodland pond (Switzerland). *Oecologia*. 96, 466-477.
- Olowu, R.A., Ayejuyo, O.O., Adeioroi, A., Adewuyi, G.O., Osundiya, M.O., Onwordi, C.T., Yusuf, K.A., Owolabi, M.S., 2010. Determination of heavy metals in crab and prawn in Ojo Rivers Lagos, Nigeria. *E-Journal of Chemistry*. 7, 526-530.
- Paglianti, A., Gherardi, F., 2004. Combined effects of temperature and diet on growth and survival of young-of-year crayfish: a comparison between indigenous and invasive species. *Journal of Crustacean Biology*. 24, 140-148
- Park, Y.S., Céréghino, R., Compin, A., Lek, S., 2003. Applications of artificial neural networks for patterning and predicting aquatic insect species richness in running waters. *Ecological Modelling*. 160, 165-280.
- Pastor, A., Medina, J., Del Ramo, J., Torreblanca, A., Díaz-Mayans, J., Fernández, F., 1988. Determination of lead in treated crayfish *Procambarus clarkii*: accumulation in different tissues. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 41, 412-418.
- Péry, A.R.R., Geffard, A., Conrad, A., Mons, R., Garric, J., 2008. Assessing the risk of metal mixtures in contaminated sediments on *Chironomus riparius* based on cytosolic accumulation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71, 869-873.
- Provincia di Rieti, Critevat - Centro Reatino di Ricerche in Ingegneria per la Tutela e la Valorizzazione dell'Ambiente e del Territorio (Sapienza - Università di Roma), 2012. Rapporto sintesi degli studi relativi all'istituzione del Parco del Velino.

- R Development Core Team, 2008. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rainbow, P.S., 1997. Ecophysiology and trace metal uptake in crustaceans. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 44, 169-175.
- Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari (G.U.U.E. Serie L n. 364 del 20 dicembre 2006).
- Reinfelder, J.R., Fisher, N.S., Luoma, S.N., Nichols, J.W., Wang, W.X., 1998. Trace element trophic transfer in aquatic organisms: A critique of the Kinetic model approach. *Science of the Total Environment*. 219, 117-135.
- Richards, C., Haro, R. J., Johnson, L.B., Host, G. E., 1997. Catchment and reach-scale properties as indicators of macroinvertebrate species traits. *Freshwater Biology*. 37, 219-230.
- Rincón-León, F., Zurera-Cosano, G., Pozo-Lora, R., 1988. Lead and cadmium concentrations in red crayfish (*Procambarus clarkii* G.) in the Guadalquivir River marshes (Spain). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 17, 251-256.
- Ristola, T., Kukkonen, J.V.K., Pellinen, J., 1999. Body residues and responses of the midge *Chironomus riparius* to sediment-associated 2,4,5-trichlorophenol in subchronic and chronic exposures. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 37, 42-49.
- Roldan, B.M., Shivers, R.R., 1987. The uptake and storage of iron and lead in cells of the crayfish (*Orconectes propinquus*) hepatopancreas and antennal gland. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 86, 201-214.
- Rosenberg, D.M., Resh, V.H., 1993. Introduction to freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates. *Freshwater Biomonitoring Benthic Macroinvertebrates*. Chapman and Hall, New York, USA. pp 1-9.
- Rubio, R., Tineo, J., Torreblanca, A., Del Ramo, J., Díaz-Myans, J., 1991. Histological and electron microscopical observations on the effects of lead on gills and midgut gland of *Procambarus clarkii*. *Toxicological & Environmental Chemistry*. 31, 347-352.

- Sánchez-López, F.J., Gil Garcia, M.D., Sánchez Morito, N.P., Martínez Vidal, J.L., 2003. Determination of heavy metals in crayfish by ICP-MS with a microwave-assisted digestion treatment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 54, 223-228.
- Sánchez-López, F.J., Gil, M.D., Martínez, J.L., Aquilera, P.A., Garrido, P.A., 2004. Assessment of metal contamination in Doñana National Park (Spain) using crayfish (*Procambarus clarkii*). *Environmental Monitoring and Assessment*. 93, 17-29.
- Sansoni, G., 1998. Atlante per il riconoscimento dei macroinvertebrati dei corsi d'acqua italiani. Provincia Autonoma di Trento.
- Santoro, A., Blo, G., Mastrolitti, S., Fagioli, F., 2009. Bioaccumulation of heavy metals by aquatic macroinvertebrates along the Basento River in the south of Italy. *Water, Air & Soil Pollution*. 201, 19-31.
- Santoul, F., Cayrou, J., Mastrolitti, S., Céréghino, R., 2005. Spatial patterns of the biological traits of freshwater fish communities in SW France. *Journal of Fish Biology*. 66, 301-314.
- Schilderman, P.A.E.L., Moonen, E.J.C., Maas, L.M., Welle, I., Kleinjans, J.C.S., 1999. Use of crayfish in biomonitoring studies of environmental pollution of the River Meuse. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 44, 241-252.
- Schipper, P.N.M., Bonten, L.T.C., Plette, A.C.C., Moolenaar, S.W., 2008. Measures to diminish leaching of heavy metals to surface waters from agricultural soils. *Desalination*. 226, 89-96.
- Selvaggi, R., Colonna, N., Lupia, F., Murgia, M.S., Poletti, A., 2010. Water quality and soil natural salinity in the Southern Imera Basin (Sicily, Italy). *Italian Journal of Agronomy*. 3, 81-89.
- Shannon, C.E., 1948. A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal*. 27, 379-423.
- Simpson, E.H., 1949. Measurement of diversity. *Nature*. 163, 688.
- Singh, K.P., Mohan, D., Singh, V.K., Malik, A., 2005. Studies on distribution and fractionation of heavy metals in Gomti river sediments - a tributary of the Ganges, India. *Journal of Hydrology*. 312, 14-27.

- Sirola, M., Lampi, G., Parviainen, J., 2004. Using Self-organizing Map in a Computerized Decision Support System. *Neural Inf. Process. 11th Int. Conf. {ICONIP} 2004. Proc. Lectures Notes in Computer Science.* 136-141
- Southwood, T. R. E., 1977. Habitat, the templet for ecological strategies? *Journal of Animal Ecology.* 46, 337-365.
- Sponseller, R.A., Benfield, E.F., Valett, H.M., 2001. Relationships between land use, spatial scale and stream macroinvertebrate communities. *Freshwater Biology.* 46, 1409-1424.
- Statzner, B., Resh, V. H., Dolédec, S., 1994. Ecology of the Upper Rhône River: a test of habitat templet theories. *Freshwater Biology.* 31, 253-554.
- Statzner, B., Hoppenhaus, K., Arens, M. F., Richoux, P., 1997. Reproductive traits, habitat use and templet theory: a synthesis of world-wide data on aquatic insects. *Freshwater Biology.* 38, 109-135.
- Statzner, B., Bis, B., Dolédec, S., Usseglio-Polatera, P., 2001. Perspectives for biomonitoring at large spatial scales: a unified measure for the functional composition of invertebrate communities in European running waters. *Basic and Applied Ecology.* 2, 73- 85.
- Statzner, B., Bady, P., Dolédec, S., Schöll, F., 2005. Invertebrate traits for the bio-monitoring of large European rivers: an initial assessment of trait patterns in least impacted river reaches. *Freshwater Biology.* 50, 2136-2161.
- Statzner, B., Bêche, L. A., 2010. Can biological invertebrate traits resolve effects of multiple stressors on running water ecosystems? *Freshwater Biology.* 55, 80-119.
- Suárez-Serrano, A., Alcaraz, C., Ibáñez, C., Trobajo, R., Barata, C., 2010. *Procambarus clarkii* as a bioindicators of heavy metal pollution sources in the lower Ebro River and Delta. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 73, 280-286.
- Tachet, H., Richoux, P., Bournaud, M., Usseglio-Polatera, P., 2006 *Invertébrés d'eau douce. Systématique, biologie, écologie.* CNRS Editions, Paris.
- Tachet, H., Richoux, P., Bournaud, M., Usseglio-Polatera, P., 2010. *Invertébrés d'eau douce. Systématique, biologie, écologie.* CNRS Editions, Paris.

- Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J., 2012. Heavy metals toxicity and the environment. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. 101, 133-164.
- Thorne, R.S., Williams, W.P., 1997. The response of benthic macroinvertebrates to pollution in developing countries: A multimetric system of bioassessment. *Freshwater Biology*. 37, 671-686.
- Touron-Poncet, H., Bernadet, C., Compin, A., Bargier, N., Céréghino, R., 2014. Implementing the Water Framework Directive in overseas Europe: A multimetric macroinvertebrate index for river bioassessment in Caribbean islands. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters*. 47, 34-43
- Türkmen, M., Ciminli, C., 2007. Determination of metals in fish and mussel species by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Food Chemistry*. 103,670-675.
- Ulsch, A., Guimaraes, G., Korus, D., Li, H., 1993. Knowledge Extraction from Artificial Neural Networks and Applications. World Transputer Congress TAT/WTC 93 Aachen, Springer.
- Usseglio-Polatera, P., Bournaud, M., Richoux, P., Tachet, H., 2000a. Biomonitoring through biological traits of benthic macroinvertebrates: how to use species data bases? *Hydrobiologia*. 422/423, 173-181.
- Usseglio-Polatera, P., Bournaud, M., Richoux, P., Tachet, H., 2000b. Biological and ecological traits of benthic freshwater macroinvertebrates: relationships and definition of groups with similar traits. *Freshwater Biology*. 43, 175-205.
- Usseglio-Polatera, P., Richoux, P., Bournaud, M., Tachet, H., 2001. A functional classification of benthic macroinvertebrates based on biological and ecological traits: application to river condition assessment and stream management. *Archiv für Hydrobiologie*. 139, 53-83.
- Usseglio-Polatera, P., Beisel, J. N., 2002. Longitudinal changes in macroinvertebrate assemblages in the Meuse river: anthropogenic effects versus natural change. *River Research and Applications*. 18, 197-211.
- Van De Guchte, C., Van Urk, G., 1989. Discrepancies in the effects of field and artificially heavy metal contaminated aquatic sediments upon midge larvae. In: Heavy Metals in the Environment, 7th International Conference, 12-15September 1989, Geneva.

- Vannote, R. L., Minshall, G. W., Cummins, K. W., Sedell, J. R., Cushing, C. E., 1980. The River Continuum Concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 37, 130-137.
- Verberk, W., Siepel, H., Esselink, H., 2008. Life-history strategies in freshwater macroinvertebrates. *Freshwater Biology*. 53, 1722-1738.
- Vermeulen, A.C., 1995. Elaboration of chironomid deformities as bioindicators of toxic sediment stress: the potential application of mixture toxicity concepts. *Annales Zoologici Fennici*. 32, 265-285.
- Vermeulen, A.C., Liberloo, G., Dumont, P., Ollevier, F., Goddeeris, B.R., 2000. Exposure of *Chironomus riparius* larvae (Diptera) to lead, mercury, and beta-sitosterol: effects on mouthpart deformation and moulting. *Chemosphere*. 41, 1581-1591.
- Vesanto, J., Himberg, J., Alhoniemi, E., Parhankangas, J., 1999. Self-organizing map in Matlab: the SOM toolbox. Proceedings of the Matlab DSP Conference 35-40.
- Vesanto, J., Himberg, J., Alhoniemi, E., Parhankangas, J., 2000. SOM Toolbox for Matlab 5. Technical Report A57, Neural Networks Research Centre, Helsinki University of Technology, Helsinki, Finland.
- Viarengo, A., 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Aquatic Sciences*, 1, 295-317.
- Vogt, G., 2002. Functional anatomy. In: DM Holdich (ed) Biology of freshwater crayfish. Blackwell Science Ltd. Oxford, United Kingdom. pp. 53-151.
- Walters, A. W., 2011. Resistance of aquatic insects to a low-flow disturbance: exploring a trait-based approach. *Journal of the North American Benthological Society*. 30, 346-356.
- Warren, L. J., 1981. Contamination of sediments by lead, zinc and cadmium - A review. *Environmental Pollution*. 2, 401-436.
- Warwick, W.F., 1985. Morphological abnormalities in Chironomidae (Diptera) larvae as measures of toxic stress in freshwater ecosystems: indexing antennal deformities in *Chironomus Meigen*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 42, 1881-1914.

- Warwick, W.F., 1988. Morphological deformities in Chironomidae (Diptera) larvae as biological indicators of toxic stress. In: Evans, M.S. (Ed.), Toxic Contaminants and Ecosystem Health. A Great Lakes focus. John Wiley and Sons, New York, pp. 281-320.
- Watts, M.M., Pascoe, D., 1996. Use of the freshwater macroinvertebrate *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) in the assessment of sediment toxicity. *Water Science and Technology*. 34, 101-107.
- Wiederholm, T., 1984. Incidence of deformed chironomid larvae (Diptera Chironomidae) in Swedish Lakes. *Hydrobiologia*. 109, 243-249.
- Yu, K.C., Tasi, L.J., Chen, S.H., Ho, S.T., 2001a. Chemical binding of heavy metals in anoxic river sediments. *Water Research*. 35, 4086-4094.
- Yu, K.C., Tsai, L.J., Chen, S.H., Ho, S.T., 2001b. Correlation analysis on binding behaviour of heavy metals with sediment matrices. *Water Research*. 4, 2417-2428.
- Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., Jiang, G., 2008. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta*. 606, 135-150.





## RIASSUNTO

I risultati delle diverse linee di ricerca per definire gli effetti della contaminazione da metalli pesanti nei sedimenti fluviali mediante una valutazione della risposta biologica degli organismi macroinvertebrati, sono di seguito riportati.

Sono state esaminate le malformazioni del *mentum* delle larve di *Chironomus riparius* (Insecta-Diptera) per valutare gli effetti tossici della contaminazione da metalli pesanti in un corso d'acqua (Torrente Genna, Italia centrale). L'area di studio è soggetta ad un'intensa attività zootecnica che comporta un incremento dell'inquinamento da metalli pesanti nei sedimenti del torrente, in particolare rame, zinco, cadmio, cromo e nichel. L'incidenza delle larve malformate è risultata molto alta, circa il 56%, e riflette la relazione con le concentrazioni dei metalli nei sedimenti, mettendo in luce come queste malformazioni possano essere considerate *endpoint* degli effetti della tossicità.

Lo studio, svolto in un'area industriale dell'Italia Centrale, ha analizzato il bioaccumulo dei metalli pesanti nei tessuti di *Procambarus clarkii* (Crustacea-Decapoda), un gambero alloctono utilizzato come bioindicatore nei sistemi d'acqua dolce. L'epatopancreas (tessuto di detossificazione) ha mostrato le più alte concentrazioni di metalli rispetto alla muscolatura addominale (tessuto non detossificante). Questa relazione tra i due tipi di tessuto può essere anche espressa dal rapporto tra i rispettivi fattori di bioconcentrazione e rappresentare un marker del livello di stress. Questo rapporto decresceva come segue: Cd (11,7) > Cu (5,5) > Pb (3,6) > Cr (1,5) > Zn (1,0), Ni (1,0). Il confronto tra il bioaccumulo dei metalli nei gamberi tra il sito inquinato esaminato e un sito di riferimento, ha confermato che i metalli accumulati in maniera significativa nell'organo di detossificazione erano cadmio e rame.

Sono state analizzate le relazioni tra le comunità di macroinvertebrati e le caratteristiche ambientali della rete idrografica di un sistema fluviale (Fiume Nestore, Italia Centrale). A tale proposito sono state selezionate dieci stazioni di campionamento, caratterizzate da 24 variabili chimiche e fisico-chimiche, e raccolti circa 37000 esemplari di macroinvertebrati appartenenti a 91 taxa. L'analisi dei tratti funzionali dei macroinvertebrati ha reso disponibile un potente strumento in grado di valutare gli effetti dell'inquinamento sulla comunità. Le stazioni che mostravano una migliore qualità ambientale hanno presentato un più ampio range di variazione stagionale per quanto riguarda l'analisi biologica rispetto all'analisi chimica; un risultato inverso è emerso quando sono state prese in considerazione le stazioni più inquinate. Tuttavia, le stazioni hanno mostrato un trend simile in relazione al livello di inquinamento sia per l'analisi chimica che per quella

biologica, sebbene l'analisi biologica fosse più efficace nel separare l'alterazione dovuta agli inquinanti a basse concentrazioni.

In questo lavoro si propone l'uso delle Self-Organizing Map (SOM, reti neurali) per illustrare i modelli di diversità dei macroinvertebrati fluviali in relazione all'inquinamento delle acque. Sono stati campionati 14 siti della rete idrografica di un sistema fluviale (Fiume Nestore, Italia Centrale) e sono stati caratterizzati per quanto riguarda la comunità di macroinvertebrati, i nutrienti e i metalli pesanti. I modelli spaziali e stagionali delle comunità sono stati messi in relazione con la qualità ambientale e l'uso del territorio nel bacino, introducendo le variabili chimiche, fisico-chimiche e i metalli pesanti nella SOM, precedentemente addestrata con i dati relativi ai macroinvertebrati. L'algoritmo delle SOM descrive in modo soddisfacente i cambiamenti qualitativi osservati nelle comunità di macroinvertebrati nello spazio e nel tempo riflettendo nel contempo il diverso grado di inquinamento anche da metalli pesanti.

È stato sviluppato e validato un indice multimetrico basato sulla comunità a macroinvertebrati, per valutare la salute ecologica in corsi d'acqua di piccola-media dimensione dell'Italia Centrale. I macroinvertebrati sono stati raccolti in 20 siti soggetti a vari livelli di inquinamento (compreso quello da metalli pesanti) seguendo un protocollo normalizzato semplificato. Tra le 71 metriche biologiche esaminate sono state selezionate le metriche che mostravano il miglior compromesso tra alta efficienza di discriminazione, bassa specificità, bassa ridondanza e alta stabilità (in condizioni di riferimento) in ognuna delle categorie d'analisi considerate, quali diversità, tolleranza, ricchezza/abbondanza e tratti bio-ecologici. Le corrispondenti quattro metriche selezionate, una per ogni categoria considerata, sono state: Indice di Margalef, Score Biological Monitoring Waters Pollution, numero di famiglie e ricchezza relativa di shredders. L'Indice soddisfa i requisiti della Water Framework Directive dell'Unione Europea (WFD) ed è stato calibrato per essere generalista, ossia per rispondere sia all'inquinamento delle acque che alla contaminazione da metalli pesanti nei sedimenti.

## RÉSUMÉ

Nous avons étudié les réponses biologiques des individus, populations et communautés d'invertébrés de rivières à la contamination des sédiments par les métaux lourds. Nous avons examiné les malformations du *mentum* des larves de *Chironomus riparius* (Insecta-Diptera) pour évaluer l'effet toxique de la contamination d'un cours d'eau, Le Genna (Italie Centrale). L'aire d'étude est soumise à une activité zootechnique intense qui accroît la pollution métallique de la rivière, notamment par le cuivre, le zinc, le cadmium, le chrome et le nickel. La fréquence des malformations larvaires (56%) a été directement liée aux contaminations, ce qui montre que les malformations du *mentum* constituent un proxy pertinent des effets toxiques sur les écosystèmes. Nous avons également analysé, dans une aire industrielle d'Italie Centrale, la bioaccumulation de métaux lourds dans les tissus de *Procambarus clarkii* (Crustacea-Decapoda), une écrevisse allochtone utilisée comme bioindicateur de la santé écologique des eaux douces. L'hépatopancréas, tissus de détoxification, a montré les concentrations de métaux les plus élevées, en comparaison aux muscles abdominaux (tissus non détoxifiant). Ce ratio de concentration entre les deux types de tissus représente un marqueur pertinent du niveau de stress bio-écologique. Le rapport décroît comme suit : Cd (11,7) > Cu (5,5) > Pb (3,6) > Cr (1,5) > Zn (1,0), Ni (1,0). La comparaison des bioaccumulations avec un site de référence non impacté confirme que les métaux qui s'accumulent de façon significative dans l'hépatopancréas sont le cadmium et le cuivre. A l'échelle des communautés, nous avons étudié les relations entre combinaison de traits fonctionnels des invertébrés et conditions environnementales (24 variables physico-chimiques) à l'échelle du réseau hydrographique (bassin du Nestore, Italie Centrale). Les stations de bonne qualité physico-chimique ont montré une plus forte variabilité dans la composition en traits fonctionnels que dans les conditions physico-chimiques. Un résultat inverse a été observé aux sites pollués, où les traits biologiques sont peu diversifiés et stables dans l'espace et dans le temps, en relation avec la chute de diversité taxonomique liée aux perturbations anthropiques. Enfin, les traits fonctionnels se sont avérés plus efficaces que les analyses physico chimiques pour détecter des changements de fonctionnement écologique lorsque les concentrations en polluants sont faibles. Les cartes auto-organisatrices de Kohonen (SOM, réseaux de neurones) ont permis de modéliser plus en détail la distribution spatio-temporelle des divers taxons en relation avec la variabilité environnementale naturelle et le niveau de pollution chimique (nutriments et métaux lourds). Nous avons enfin développé et validé un indice multimétrique basé sur les communautés d'invertébrés, pour évaluer la santé écologique des

cours d'eau d'Italie Centrale en terme d'écart à la référence. Sur 71 métriques biologiques testées, nous n'avons retenues que celles qui présentent le meilleur compromis en terme d'efficacité de discrimination, de faible spécificité et de faible redondance, et montrant une grande stabilité en conditions de référence. Ces métriques, qui renseignent sur la diversité, l'abondance, le rôle fonctionnel et la tolérance des organismes sont : l'indice de Margalef, le score "Biological Monitoring Water Pollution", le nombre de familles et la richesse relative des déchetes. Cet indice, qui satisfait les pré requis de la Directive Cadre sur l'Eau de l'Union Européenne, répond de façon significative à la pollution des eaux douces et à la contamination des sédiments par les métaux lourds.

## ABSTRACT

We studied the biological responses of individuals, populations and invertebrate communities to river sediment contamination by heavy metals. We examined the deformities of the *mentum* of *Chironomus riparius* larvae (Insecta, Diptera) to assess toxic effect of contamination of streams, the Genna (Central Italy). The study area is subjected to intense livestock activity that increases the metal pollution of the river, including copper, zinc, cadmium, chromium and nickel. The frequency of larval malformations (56%) was directly related to contamination, which shows that malformations of the *mentum* form a relevant proxy of toxic effects upon ecosystems. We also analyzed, in an industrial area of Central Italy, the bioaccumulation of heavy metals in the tissues of *Procambarus clarkii* (Crustacea-Decapoda), a non-native crayfish used as a bio-indicator of the ecological health of freshwaters. The hepatopancreas, a detoxifying tissue, showed the highest metal concentrations compared to the abdominal muscles (non detoxifying tissue). This concentration ratio between the two types of tissues is a relevant marker of bio-ecological stress. The ratio decreased as follows: Cd (11.7) > Cu (5.5) > Pb (3.6) > Cr (1.5) > Zn (1.0), Ni (1.0). Comparison of bioaccumulations with a non-impacted reference site confirms that those metals that significantly accumulate in the hepatopancreas are cadmium and copper. At the community level, we studied the relationships between the combination of invertebrate functional traits and environmental conditions (24 physical-chemical variables) across the stream system (Nestore Basin, Central Italy). Stations with a good physical-chemical status showed higher variability in their composition of functional traits than in their physical-chemical variables. An opposite trend was observed in the polluted sites, where biological traits are poorly diversified and stable in space and in time, in relation to the decrease in taxonomic diversity linked to human disturbance. Finally, functional traits have proven more effective than physical-chemical analyzes in detecting changes in ecological functioning of streams when contaminant concentrations are low. The self-organizing map algorithm (SOM neural networks) was used to further model the spatial and temporal distribution of the various taxa in relation to the natural environmental variability and the level of chemical pollution (nutrients and heavy metals). Finally we have developed and validated a multimetric index based on invertebrate communities, to assess the ecological health of rivers of Central Italy in terms of deviation from a reference state. Out of 71 tested biological metrics, we retained those metrics that showed the best compromise in terms of discrimination efficiency, low specificity and low redundancy, and higher stability under reference conditions. These metrics, which provide information on the diversity, abundance, functional role and

tolerance of organisms are: the Margalef index, the "Biological Monitoring Water Pollution" score, the number of families and the relative richness of shredders. This index, which complies with the prerequisites of the Water Framework Directive of the European Union responds significantly to freshwater pollution and sediment contamination by heavy metals.







## **RINGRAZIAMENTI**

Ringrazio sinceramente i miei tre tutor, il Prof. Enzo Goretti, il Prof. Régis Céréghino e la Prof.ssa Elda Gaino, per la disponibilità dimostrata, la grande professionalità, per avermi fornito in ogni momento la consulenza scientifica e gli aiuti necessari, per avermi aiutato in tutte le fasi del lavoro di tesi e per essere stati sempre presenti in ogni passo di questo percorso.

Ringrazio calorosamente la Prof.ssa Roberta Selvaggi e il Prof. David Cappelletti per le preziose consulenze scientifiche e il grande aiuto fornito per la parte chimica del lavoro di tesi.

In ultimo, il ringraziamento più grande va a tutte le persone (studenti, tirocinanti, laureandi, assegnisti, borsisti e dottorandi) con cui ho collaborato, e praticamente convissuto, durante questi anni di dottorato, perché, oltre ad aver contribuito in maniera sostanziale alla realizzazione di questa tesi, hanno reso questi anni indimenticabili.



